UNTERSUCHUNGEN ZUM HÄMOGLOBINABBAU UND DEM MECHANISMUS DER CHLOROQUIN-WIRKUNG UND -RESISTENZ IN CHLOROQUINSENSIBLEN UND -RESISTENTEN ERREGERN EINER EXPERIMENTELLEN NAGETIER-MALARIA (NK 65 PLASMODIUM BERGHEI)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
KOFI S.O. ASANTE
aus OBO-KWAHU/GHANA

1985

UNTERSUCHUNGEN ZUM HÄMOGLOBINABBAU UND DEM MECHANISMUS DER CHLOROQUIN-WIRKUNG UND -RESISTENZ IN CHLOROQUINSENSIBLEN UND -RESISTENTEN ERREGERN EINER EXPERIMENTELLEN NAGETIER-MALARIA (NK 65 PLASMODIUM BERGHEI)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
KOFI S.O. ASANTE
aus OBO-KWAHU/GHANA

1985

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1985

Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weser

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Dr. A. Jung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke (Direktor des Instituts) in der Zeit von Oktober 1981 bis Mai 1985 am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen angefertigt.

Herrn Professor Dr. D. Mecke danke ich für sein großes Interesse an meiner akademischen Ausbildung.

Herrn Dr. A. Jung danke ich für seine stete Diskussionsbereitschaft, für wertvolle Anregungen, sowie für die großzügige Unterstützung, mit der er diese Arbeit gefördert hat.

Für die Einweisung in der in vitro Kultivierung von Plasmodium falciparum danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. D. Spira von der Hebrew University, Jerusalem, Israel.

Herrn Prof. Dr. Schneider und seinen Mitarbeitern danke ich herzlich für die Blutentnahme der Blutspender zur Serumgewinnung.

Herrn Dr. D. Walliker vom Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh, danke ich sehr für die Bereitstellung von T9-96 und T9-102 Plasmodium falciparum Stämme und Herrn Dr. D. Warhurst der London School of Hygiene and Tropical Medicine, UK, für ^{14}C-Chloroquin.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Guglielmi für sein Interesse an meiner akademischen Ausbildung.

Meinen Arbeitskollegen Frau J. Backes, Dipl.-Biochemiker K. Pollmann, Dipl.-Biochemiker J. Treumer, Dipl.-Biologe G. Fritsch, Dipl.-Biologin B. Bleiholder, Dipl.-Biochemikerin A. Dieckmann, Dipl.-Biochemikerin B. Menz, Herrn Dr. C. Zhao, Herrn Ya Zhang und Dipl.-Biochemiker I. Ragoussis danke ich herzlich für ihre vielfältige Unterstützung bei der Durchführung meiner Untersuchungen.

Herrn Dr. H.J. Reinecke (Leiter des Zentralen Isotopenlabors der Universität Tübingen) und seinen Mitarbeitern (Herr Bierbaum, Frau Deutschle, Herr Schmidt und Herr Stumpp) danke ich sehr für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Ich danke dem DAAD für die Gewährung eines Studien- und Promotionsstipendiums.
Herrn Dr. Peter Kasprzyk, Referent des Programmbereichs, danke ich sehr für sein großes Interesse an meinem Wohlergehen.

Meiner Frau, Mabel Yeboah Akyeampong, danke ich sehr für das mir in diesem Zeitraum entgegengebrachte Verständnis.

Diese Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung der World-Health Organization und der Münchner Apparatebau GmbH durchgeführt.

ABSTRACT

Kofi S.O. Asante

A comparative study of haemoglobin degradation in chloroquine-sensitive (CS) and chloroquine-resistant (CR) P. berghei infected rat erythrocytes, previously radio-labelled in vivo with ^{59}Fe, has been carried out under in vivo conditions. After cell lysis in 4 % Triton, samples were subjected to agarose-gel isoelectric focusing (IEF) within the pH range of 3-10. The distribution of radioactivity in the resulting gel was quantitatively and autoradiographically evaluated. Four distinctive features were observed:

1) Isoproteins of rat haemoglobin: All the isoproteins (about 13), with the exception of one, were digestible by both CS and CR parasites. Digestion was pronounced during the mid and late phases of blood schizogony.
2) An immobile component representing the malaria pigment (P): The malaria pigment appeared as a darkly coloured and iron containing material which always remained at the point of application. In the CS strain an increase in radioactivity up to about 65 % of the total radioactivity in the erythrocyte at the end of blood schizogony was observed. On the contrary, a corresponding value of about 5 % was registered for the CR strain.
3) An anodic and iron-containing component designated here as "X": Although this component was present in fractions obtained from both strains of parasites, there was a high preponderance of it in the CR strain during the mid and late phases of blood schizogony (10-15 %).
4) The specific radioactivity (cpm/rbc) of erythrocytes infected with the CS P. berghei was higher than those infected with the CR strain. This would suggest that whilst haem units generated during blood schizogony of the CS strain are sequestered in malaria pigment, these are possibly expelled from the cell in infections involving the CR strain. This supports the fact that the induction of liver biliverdin reductase was higher in rats infected with the CR strain than those infected with the CS strain.

ABKÜRZUNGEN

ACD	Acid Citrose Dextrose
CFL	Chloroquin-Freie-Linie
CR	Chloroquin-Resistent
CS	Chloroquin-Sensibel
CL	Chloroquin-Linie
DDT	Dichlordiphenyltrichloräthan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Hb	Hämoglobin
HBs	Isoproteine von Hämoglobin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic Acid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
αKG	α-Ketoglutarat(mono Natrium Salz)
KPP	Kaliumphosphatpuffer
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz
NMRI	Naval Medical Research Institute
NE	Nicht Parasitierte Erythrocyten
NPP	Nicht Pigment produzierende Parasiten
P	Das Malaria-Pigment
PP	Pigment produzierende Parasiten
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PE	Parasitierte Eryhtrocyten
SC	Sucrose-Citrat-Medium
PMS	Phenazin-Methosulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
T4/T2	4 %-ige bzw. 2 %-ige Tritonlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)Aminomethan
WRAIR	Walter Reeds Army Institute of Research
WHO	World Health Organization

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND GERÄTE	14
2.1.	Chemikalien	14
3.	METHODEN	17
3.1.	Haltung der Nagetier-Malaria-Erreger Plasmodium berghei (in vivo)	17
3.2.	Plasmodien-Arten und deren Haltung	17
3.3.	Blutgewinnung; Parasitierte und nicht parasitierte Erythrocyten (bzw. PE und NE)	18
3.4.	Zellfärbung	18
3.4.1.	Giemsafärbung	18
3.4.2.	Brillantkresylblau-Färbung	18
3.5.	Kultivierung des Human Malaria-Erregers (Plasmodium falciparum) in vitro	19
3.5.1.	Herstellung des Waschmediums	19
3.5.2.	Das Kulturmedium	19
3.5.3.	Serumgewinnung zur Kultivierung	19
3.5.4.	Die Malaria-Kultur	20
3.5.4.1.	Waschen des Bluts	20
3.5.4.2.	Infizieren der gewaschenen Erythrocyten	20
3.5.4.3.	Kultivierung der infizierten Eryhtrocyten (Nach Trager and Jensen 1976)	20
3.5.4.4.	Splittieren der Kultur ("making a split")	21
3.6.	Synchronisation	21
3.6.1.	Sorbitol-Behandlung (Nach Lambros and Vanderberg 1979)	21
3.6.2.	Gelatine-Behandlung (Nach Jensen and Trager 1978)	21
3.7.	Kryopreservierung von Plasmodium falciparum	22
3.7.1.	Lösungen	22
3.7.2.	Einfrieren der Zellen	22
3.7.3.	Auftauen der Zellen	22

3.8.	Parasitenisolierung durch Lektinvernetzung	23
3.9.	Enzym-Messungen	24
3.9.1.	Bestimmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.149)	24
3.9.2.	Bestimmung der $NADP^+$-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (EC. 1.4.1.4) (Mod. nach Schmid 1970)	25
3.9.3.	Bestimmung der Hämoxygenase (EC. 1.14.99.3)	25
3.9.4.	Bestimmung der Biliverdin-Reduktase (EC. 1.3.1.24) (Mod.Singelton et al.1965)	27
3.9.5.	Bestimmung der Katalase (EC 1.11.1.6) (Mod. Beutler)	28
3.10.	Aktivitätsanfärbung	28
3.10.1.	Lactat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.27) (Mod. nach Carter 1978)	29
3.10.2.	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.149)	29
3.10.3.	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.44)	29
3.10.4.	Glucosephosphat-Isomerase (EC. 5.3.1.9)	29
3.11.	Untersuchungen zum Hämoglobinabbau	31
3.11.1.	In vivo-Markierung von Rattenerythrozyten mit ^{59}Fe (Unterdruckbehandlung) (Mod. nach Rüssmann, in der Apparatur nach Treumer)	31
3.11.2.	Vergleichender Abbau des Hämoglobins in mit Chloroquin-resistenten und Chloroquin-sensiblen P.berghei infizierten Rattenerythrocyten	32
3.12.	Isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation (Percoll-Gradient)	32
3.13.	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	34
3.13.1.	Vorbereitung der Platten	34
3.13.2.	Agarose IEF	35
3.13.3.	Auftragen der Probe und Trennung	35

3.14.	Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Mod. nach Laemmli, 1970)	36
3.14.1.	Herstellung des Gels	36
3.14.2.	Gelfärbungen	38
3.14.2.1.	Coomassiefärbung (Mod.König eta l. 1970)	38
3.14.2.2.	Silberfärbung (Mod.Oakley et al. 1980)	39
3.15.	Autoradiographie	40
3.16.	Hämatinbestimmung	40
3.16.1.	Alkalische Extraktion	40
3.16.2.	Phenolextraktion (Rimington et al. 1947)	40
3.17.	Malaria-Pigment	41
3.17.1.	Extraktion des Malaria-Pigments aus Milz und Leber von Ratten	41
3.17.2.	Isolierung des Malaria-Pigments aus P.berghei infizierten Erythrocyten	41
3.17.3.	Lyse mit destilliertem Wasser	42
3.18.	Analyse des Ratten-Serums im Ablaufe der Parasitämie	42
3.18.1.	Chromatographische Analyse des Serums (CR und CS)	42
3.19.	Analyse des Ratten-Harns	43
3.20.	Untersuchung zum Chloroquin-Stoffwechsel in Chloroquin-sensiblen und -resistenten Plasmodium falciparum	43
3.20.1.	Plasmodium-Stämme: Plasmodium falciparum (T9-96) Plasmodium falciparum (T9-102)	43
3.20.2.	Chloroquin-Behandlung	44
3.20.2.	Chloroquin-Stoffwechsel (mit ^{14}C-Chloroquin)	44
3.21.	Untersuchung zur Reversion. Wiederherstellung der Chloroquin-Empfindlichkeit	45
3.22.	Untersuchung zur Beeinflussung der Parasitämie-Entwicklung und Pigmentbildung in chloroquinresistenten P. berghei (NK65) in Abhängigkeit von der Chloroquin-Dosis	45

3.23.	Bestimmung des Carbomonoxy-Hämoglobingehalts im Blut von mit Chloroquin-sensiblen und -resistenten P.berghei infizierten Ratten (Mod. nach Richterich 1968)	46
4.	ERGEBNISSE	48
4.1.	Verlauf der Parasitämie bei Chloroquin-resistenten und -sensiblen P. berghei in der Ratte	48
4.2.	Chloroquin-Behandlung der Chloroquin-sensiblen Infektion in der Ratte	48
4.3.	Hämoglobinabbau in Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten Plasmodium berghei	57
4.3.1.	Bestimmung als Hämatin	57
4.3.2.	Bestimmung als Änderung im Eisen-59-Gehalt	57
4.3.2.1.	In vivo Markierung der Ratten-Erythrocyten mit Eisen-59	57
4.3.2.2.	Änderung des Eisen-Gehalts während der Blutschizogonie	57
4.3.4.	Bande X	72
4.4.	SDS-PAGE-Analyse der Eisen-59-Proben von Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten Plasmodium berghei infizierten Ratten-Erythrocyten nach der Dichtegradienten-Zentrifugation (Percoll-Gradient)	72
4.4.1.	Fraktionen von Chloroquin-sensiblen P. berghei infizierten Erythrocyten	72
4.4.2.	Fraktionen von Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten Erythrocyten	76
4.5.	Schicksal der Häm-Gruppen während der intraerythrocytären Vermehrung der Chloroquin-resistenten (CR) Plasmodium berghei	76
4.6.	SDS-PAGE-Analyse des Serums im Ablaufe der Parasitämie	80
4.7.	Enzymatischer Abbau von Häm	87

4.7.1.	Messung von parasitärer Hämoxygenase	87
4.7.2.	Messung von parasitärer Biliverdin-Reduktase	89
4.7.3.	Einfluß der Parasitämie auf Ratten-Leber Biliverdinreduktase	89
4.7.4.	Messung des Kohlenmonoxidhämoglobins	89
4.8.	Untersuchungen zum Malaria-Pigment	91
4.8.1.	Spektraleigenschaften des Malaria-Pigments und anderer Porphyrine	92
4.8.2.	SDS-PAGE-Analyse des Malaria-Pigments	98
4.9.	Reversion	98
4.10.	Empfindlichkeit der zweiten Chloroquin-freien Linie gegenüber Chloroquin	103
4.11.	Chloroquin-Stoffwechsel in Chloroquin-resistenten und -sensiblen Plasmodium berghei (in vivo) und Plasmodium falciparum (in vitro)	103
4.11.1.	Chloroquin-resistente (CR) und -sensible (CS) Plasmodium berghei (in vivo)	103
4.11.2.	Chloroquin-resistente (CR) und -sensible (CS) Plasmodium falciparum (in vitro)	103
4.12.	Isoenzym-Muster ausgewählter Enzyme in Chloroquin-resistenten und -sensiblen Malaria-Parasiten (P. berghei und P. falciparum)	109
5.	DISKUSSION	115
6.	ZUSAMMENFASSUNG	132
7.	LITERATURVERZEICHNIS	135

1. EINLEITUNG

Für ein Drittel der Weltbevölkerung stellt die Malaria eine der häufigsten parasitären Krankheiten dar. Sie ist verantwortlich für viele Todesfälle und bringt verheerende sozio-ökonomische Probleme mit sich. Zur Veranschaulichung der Probleme parasitärer Krankheiten sind folgende Zahlen zu nennen: Filariasis, mit über 250 Millionen Opfern, mit steigender Tendenz ; Onchocerciasis mit etwa 20 Millionen Opfern, hauptsächlich an der Westküste Afrikas; davon werden etwa 6 Millionen blind (Busvine 1979).
1979 erkrankten schätzungsweise über 200 Millionen Menschen an Malaria, davon über 2 Millionen tödlich (Cox 1981).

Biologisch gesehen sind die Erreger der Malaria obligate intrazelluläre Parasiten mit einem sehr komplizierten Lebenszyklus; hierbei durchlaufen sie in der Überträgermücke eine geschlechtliche und in den Leberzellen und in den roten Blutkörperchen der verschiedensten Warmblüter - so auch beim Menschen - eine ungeschlechtliche Vermehrungs- und Reifephase.

Während die Leberpassage beim Warmblüter bzw. beim Menschen ohne eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens einhergeht, treten bei der Vermehrungsphase in den roten Blutkörperchen (Blutschizogonie) die Krankheitssymptome auf, die unter dem Begriff Malaria zusammengefaßt werden (Abb. 1).

Malaria des Menschen wird durch folgende Plasmodienarten hervorgerufen:

- Plasmodium falciparum (Erreger der Malaria tropica)
- Plasmodium malariae (Erreger der Malaria quartana)
- Plasmodium vivax und Plasmodium ovale (Erreger der Malaria tertiana).

Unter den vier Arten der Erreger ist Plasmodium falciparum am gefährlichsten mit Mortalitätsraten von über 10 %, vor allem bei Kindern.

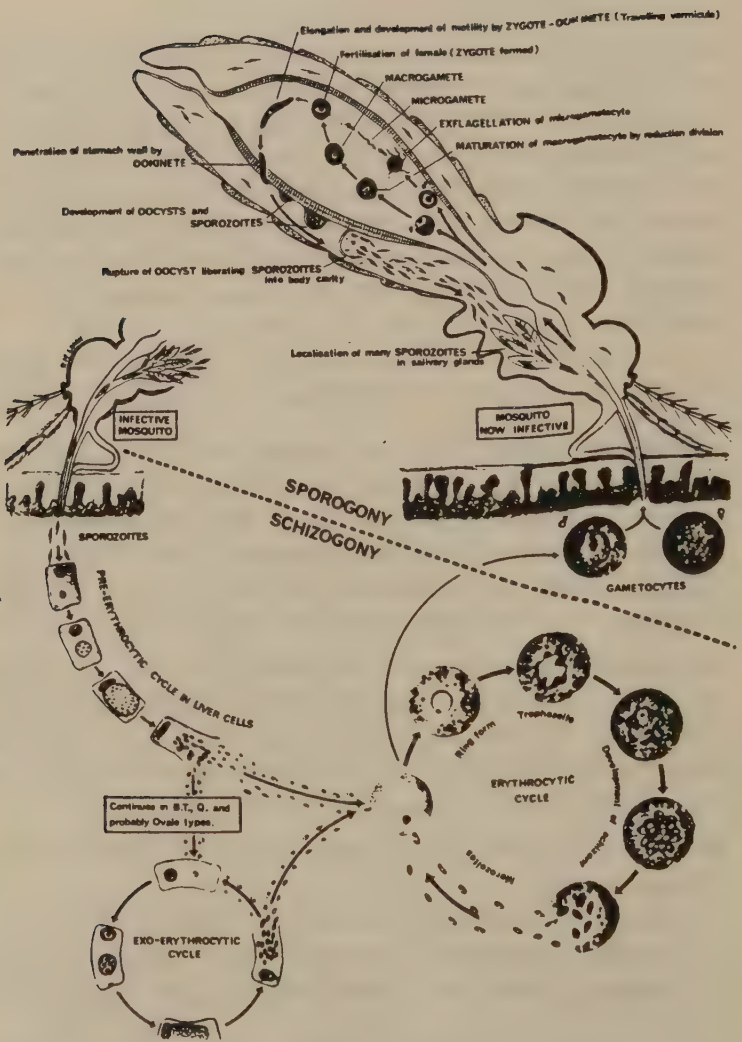


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lebenszyklusses von Plasmodium falciparum, dem Erreger der Malaria tropica (Jeffrey and Leach 1975)

Bemühungen, die Krankheit auszurotten, wurden auf zwei Ebenen durchgeführt:

a) Ausrottung der Überträgermücke (Vector plane) durch den Einsatz von Organochloriden (z.B. DDT), Phosphosäureestern (z.B. Parathion) und Carbamaten (z.B. Carbaryl).
b) Vernichtung der Parasiten durch chemotherapeutische Angriffe. Hierzu wurden folgende Antimalaria-Mittel verwendet: Chinin, Mepacrin, Dihydrofolat-reduktase-Inhibitoren (DHFR-Inhibitoren), z.B. Pyrimethamin, Proguanil, Cycloguanil (Embonat und Trimethoprim), 4-Aminochinoline (z.B. Chloroquin. Abb. 2), Sulfonamide und Sulfone (z.B. Sulfamethoxypyridazin, Sulfadimethoxin, Sulfadoxin und Sulfalen).

Am Anfang wurden große Erfolge durch Anwendung von Insektiziden (DDT) erzielt, die allerdings kurzfristig waren: die Insekten wurden resistent gegen die üblichen Insektizide. Ein weiterer Faktor beschränkte außerdem die Anwendung von DDT, und zwar dessen Toxizität für Menschen, Haustiere und Nutzpflanzen. Die Wiederkehr der Malaria in den sechziger und siebziger Jahren mit Insektizid-Resistenz und nunmehr fortgeschrittener Drogen-Resistenz, insbesondere Plasmodium falciparum-Resistenz gegen Chloroquin, führte dazu, daß mehr auf dem Gebiet der Chemotherapie geforscht wurde. Bis 1974 wurden 250 000 chemische Verbindungen von WRAIR in verschiedenen Tiermodellen getestet, wobei sich das Chinolin-Methanol-Derivat Mefloquin als die meistversprechende Substanz herausgestellt hat (Canfield und Rozman 1974). Unter den gegen die Blutformen wirksamen Antimalariamitteln ist das Chloroquin hervorzuheben, da es bei guter Antimalariawirkung auch bei längerer Einnahme relativ wenige Nebenwirkungen zeigt (abgesehen von der Auslösung hämolytischer Krisen bei verschiedenen hereditären hämolytischen Anämien). Chloroquin wird auch bei rheumatischen und Kollagen-Erkrankungen (Burns 1966) und Porphyria Cutanea tarda (Felsher 1966) therapeutisch eingesetzt; die Nebenwirkung, die man

in diesem Anwendungsbereich häufig sieht (Retinopathie) ist bedingt durch die hohe Konzentrationen von Chloroquin, die hier verwendet werden.

Weitere Vorteile von Chloroquin gegenüber allen anderen Antimalariamitteln sind:

- Die langjährige Erfahrung mit Chloroquin, die keine Anzeichen von mutagener oder carcinogener Aktivität ergeben hat.
- Die Resistenzentwicklung gegen Chloroquin verläuft wesentlich langsamer als gegen die anderen Antimalariamittel (z.B. DHFR-Inhibitoren). Es wurden schon nach zweijährigem Einsatz der Folatantagonisten (DHFR-Inhibitoren) bereits gegen dieses Drogen resistente Erregerstämme von Plasmodium falciparum beobachtet (WHO. Technical Report Series No. 529, p. 48, 1973).

Auf Grund des Stellenwertes von Chloroquin in der Malaria-Chemotherapie ist die Entwicklung chlorquin-resistenter Stämme von P. falciparum, über die zuerst von Moore und Lanier (1961) aus Kolumbien berichtet wurde, besonders besorgniserregend.

Seither hat sich die Chloroquin-Resistenz von den Primärherden her ausgebreitet (Wernsdorfer 1983).

In Schwarzafrika war Chloroquin-Resistenz bis vor kurzem unbekannt. Erst 1978/79 wurde das Phänomen von vielen Autoren beschrieben (Campbell et al 1979; Deloron et al 1983, Ekue et al 1983, Fogh et al 1979, Kean 1979 und Jepsen et al 1983).

Eine Chloroquin-Resistenz ist seither in vielen Teilen Afrikas, z.B. Madagaskar, den Komoren, Kenia, Tansania, Sudan, Burundi, Uganda, Malawi, Sambia und möglicherweise auch in Somalia sowie in Osten von Zaire beobachtet worden (Fernex 1984, Wernsdorfer 1983). Von der Westküste Afrikas in Lambarene (Gabun) ist ebenfalls kürzlich das Auftreten von Chloroquin-Resistenz von Wernsdorfer (1983) beschrieben worden.

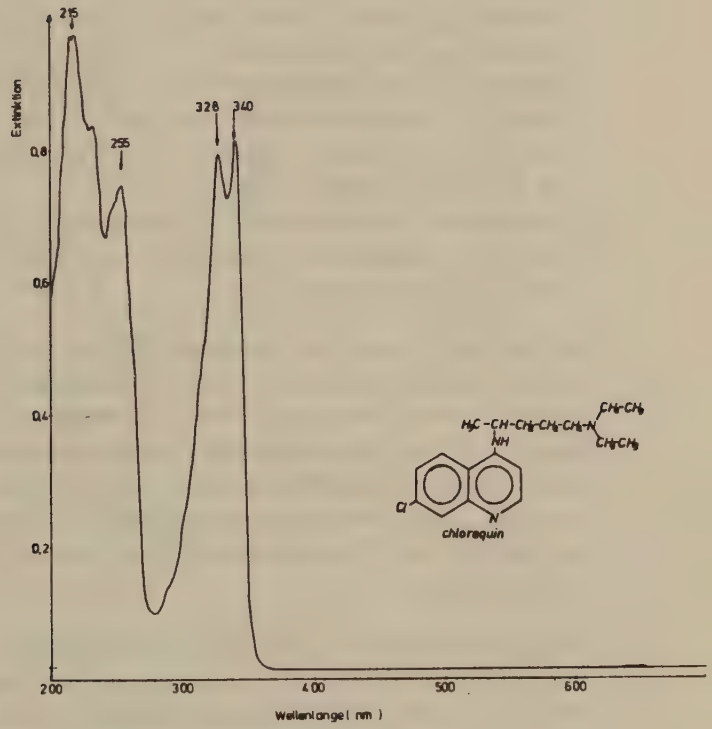


Abbildung 2: Chloroquin: Chemische Struktur und dessen Absorptionsspektrum in Wasser

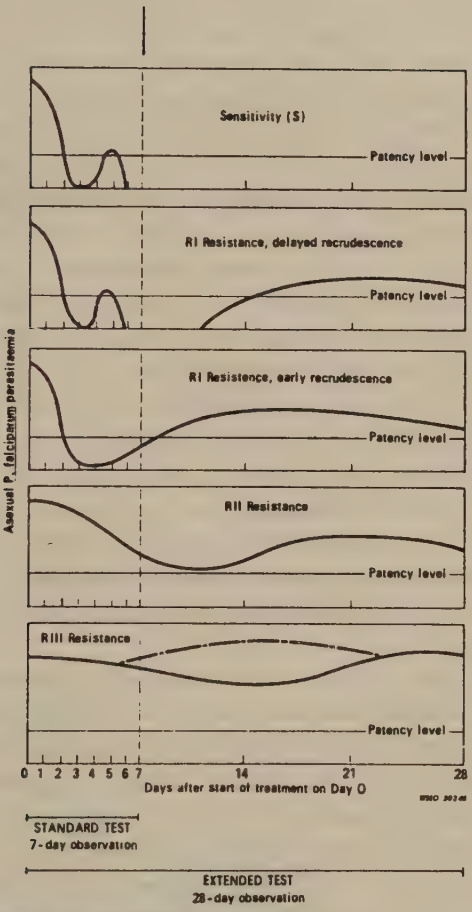
Es werden heute folgende klinische Resistenzgrade unterschieden:

- Chloroquin-Resistenzgrad I ist gegeben, wenn innerhalb von 7 Tagen nach Beginn einer Therapie bei klinisch manifester Malariainfektion keine Malaria-Plasmodien mehr nachweisbar sind; diese jedoch innerhalb von 3 Wochen wieder im Blut erscheinen.
- Chloroquin-Resistenzgrad II ist gegeben, wenn die Anzahl der Plasmodien unter der Behandlung lediglich verringert wird, diese jedoch nach 7 Tagen Behandlungsdauer im Blut nachweisbar sind.
- Chloroquin-Resistenzgrad III ist gegeben, wenn die Zahl der Plasmodien durch die Behandlung nicht wesentlich beeinflußbar ist (Abb. 3).

Das Auftreten von Chloroquinresistenzen hat dazu geführt, daß in den letzten Jahren große Forschungsanstrengungen zum Verständnis der Biochemie des Malaria-Erregers und zur Aufklärung des der Chloroquinresistenz zugrundeliegenden Mechanismus gemacht worden sind. Trotz allem ist bis jetzt über den genauen Wirkungsmechanismus von Chloroquin und die der Resistenz zugrunde liegenden Mechanismen nichts genaues bekannt.

Während der hochtourigen intra-erythrocytären Vermehrung der Malariaparasiten wird das Wirtszellstroma (überwiegend Hämoglobin aber auch andere Proteine) von den Parasiten zu 75 % für dessen metabolischen Zwecke abgebaut (Groman 1951, Hempelmann 1977, Jung et al 1984); hierbei nimmt der Gesamtproteingehalt der infizierten Zelle (Parasit und "Resterythrocyt") auf etwa 50 % ab. Gleichzeitig sinkt der Gesamtstickstoff und Gesamtkohlenstoff ebenfalls auf etwa die Hälfte der ursprünglichen Werte ab (Jung et al 1984).

Die aus dem Hämoglobinabbau resultierenden Hämreste oder Porphyrine werden in den sensiblen Stämmen der Malaria-Erreger zum sogenannten Malariapigment (Hämozoin) polymerisiert und abgelagert.



* Chloroquine administered during the first 3 days.

———— Patent parasitaemia may reappear by day 5; in sensitive (S) strains, however, it is absent on and after day 6.

—·—·— There may be an increase in parasitaemia in RIII resistance.

Note that it is not possible to distinguish between S and RI in the standard (7-day) test.

(WHO Technical Report Series No. 529, 1973)

Abbildung 3: Verschiedene Grade der Chloroquin-Resistenz (WHO-Definition)

Bei Plasmodium falciparum bilden sowohl Chloroquin-sensible als auch die -resistente Stämme das Malariapigment (McNamara 1967). Bei der Nagetiermalaria (P. berghei) ist dagegen zu beobachten, daß der Chloroquin-resistente Stamm im Gegensatz zu dem entsprechenden sensiblen Stamm kein oder deutlich weniger Pigment enthält (Peters 1964).
Es ist nicht auszuschließen, daß dieser morphologische Unterschied in der Pigmentbildung darauf beruht, daß bei der experimentellen Malaria (in vivo) die verabreichte Chloroquinkonzentration um eine Zehnerpotenz höher liegt, als die beim Menschen eingesetzten therapeutischen Dosen.
Der morphologische Unterschied in der Pigmentbildung und zwei weitere Beobachtungen, nämlich
daß die Wirkung von Chloroquin nur zur Geltung kommt, wenn der Parasit einen aktiven Hämoglobinabbau betreibt (Marchiafava and Mignami 1894) und
die klinische Anwendung von Chloroquin zur Behandlung der Porphyria Cutanea tarda; hier wird die Bildung eines wasserlöslichen Chloroquin-Porphyrin-Komplexes und dessen eventuelle Ausscheidung mit dem Urin postuliert (Felsher und Redeker 1966)
haben die Forschung zur Wirkung von Chloroquin bei Malaria in eine bestimmte Richtung gelenkt: Hämoglobin und dessen Abbauprodukte wurden in Verbindung mit der Chloroquin-Wirkung und Resistenz in der Malaria-Chemotherapie gebracht. Schueler und Cantrell (1964), Cohen et al (1964) berichteten über eine Komplex-Bildung zwischen Chloroquin und "ferrihaemic acid" an Hand von spektrophotometrischen Untersuchungen. Es wurde ferner gezeigt (in vivo), daß dieser Chloroquin-ferrihaemic acid-Komplex in der Lage war, die antiparasitäre Wirkung von Chloroquin herabzusetzen. Weitere Unterstützung fand die Pigment-Chloroquin/Ferrihaemic acid-Chloroquin-Komplex-These in der Arbeit von Warhurst und Hockley (1967). Diese Autoren berichteten über Klumpung des Malariapigments in Erythrocyten, nach Verabreichung chemotherapeutisch wirksamer Dosen von Chloroquin an infizierte Mäuse.

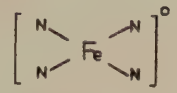
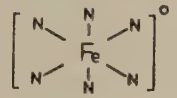
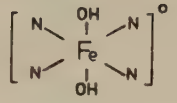
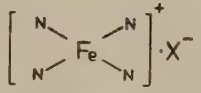
	NOMENKLATUR		
	VALENZ VON EISEN	NOMENKLATUR-SYSTEM	ALLGEMEIN
	2 EISEN ENTFERN BAR DURCH BEHANDLUNG MIT EISESSIG UND AUCH VERD. HCl	FERROPORPHYRIN	HÄM
	2	BASE(z.B.pyridin)-FERRO-PORPHYRIN	HÄMOCHROME
	3 EISEN ENTFERN BAR MIT KONZ. SCHWEFEL-SÄURE	FERRIPORPHYRINHYDROXID	HÄMATIN
	3	FERRIPORPHYRINCHLORID	HÄMIN

Abbildung 4a: Nomenklatur der Porphyrine

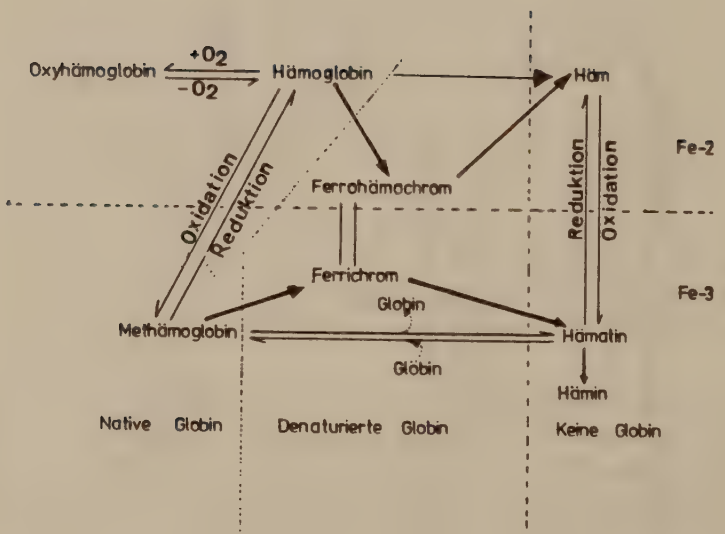


Abbildung 4b: Umwandlungen der Porphyrine

Macomber und Sprinz (1967), Peters (1968) und Howells et al (1968) machten die gleiche Beobachtung. Parasitierte Erythrocyten akkumulieren größere Mengen von Chloroquin als nicht infizierte Erythrocyten. Die mit einem chloroquinsensiblen Stamm von P. berghei infizierten Erythrocyten akkumulieren 2-3 mal mehr Chloroquin als die, die mit einem Chloroquin-resistenten Stamm infiziert waren (Macomber et al. 1966); sie schlugen infolgedessen einen aktiven Konzentrierungsmechanismus in den parasitierten Erythrocyten vor.
Fitch (1969) sprach von einem Fehlen von "high-affinity binding of chloroquin" in dem chloroquin-resistenten Stamm von P. berghei. Hier ist auch die Suche nach der "high-affinity binding site" mit dem morphologischen Unterschied zwischen den Chloroquin-resistenten und -sensiblen Plasmodium berghei verknüpft. Fitch and Chevli (1981), Fitch (1983) haben postuliert, daß Ferriprotoporphyrin IX (Abb. 4 + 5) die "high-affinity binding site" ist.

Weitere Mechanismen der Chloroquin-Wirkung werden in einer Reihe von Arbeiten postuliert.
Chloroquin hemmt unter anderem (in vitro) Enzyme der Glykolyse (Fraser und Kermack 1957) hydrolytische und respiratorische Enzyme (Howells et al 1970) die Ornithin Decarboxylase (Königk und Putfarken 1983), RNA-Polymerase und DNA-Polymerase (Ciak und Hahn 1965), Glutamatdehydrogenase aus Malariaparasiten (Asante 1981) und aus Leber (Jung, persönliche Mitteilung). Trotz dieser in vitro Beobachtungen, hat man keine alarmierende Nebenwirkung an Patienten, die diese Medikamente über einen längeren Zeitraum nehmen, beobachtet, die auf eine in vivo Hemmung dieser Enzymsysteme durch Chloroquin hinweisen. Ferner ist die Chloroquin-Konzentration zur Hemmung dieser Enzyme (in vitro) mit 10^{-4}M im Vergleich zur therapeutisch wirksamen Konzentration 10^{-6}M bei Malaria sehr hoch.

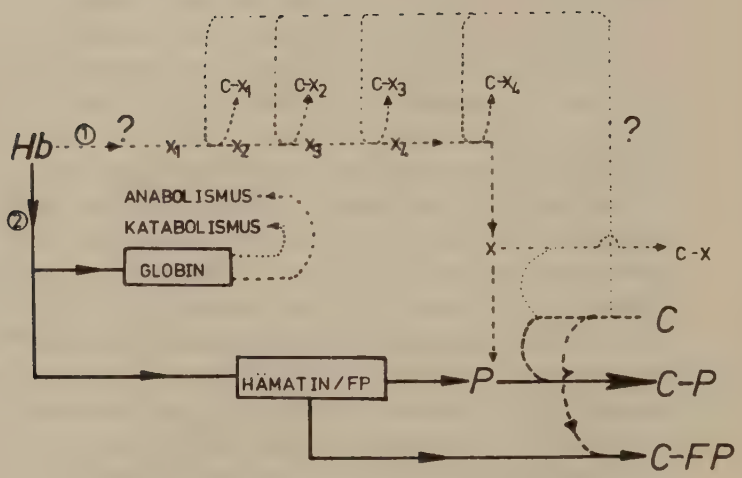


Abbildung 5: Darstellung der zur Zeit vorherrschenden Theorien zum Hämoglobinabbau und die möglichen Wechselwirkungen zwischen partiell abgebauten Hämoglobin an freigesetzten Porphyrinen (Hamatin/Ferroporphyrin), dem Malariapigment (P) und dem Chloroquin (C).

1) Partieller Hämoglobinabbau (Sherman 1970).Xn sind hypothetische Zwischenprodukte die mit Chloroquin Komplexe (C-X) eingehen sollen.

2) Totaler Hämoglobinabbau. Hier kommt es zu einer Abspaltung des Ferriprotoporphyrins vom Globin und zur Bildung von Pigment. Sowohl Pigment als auch Ferriprotoporphyrin bilden mit Chloroquin Komplexe (C-P und C-FP) (Fitch 1983, Schueler et Cantrell, 1964).

Die Freßvakuolen von Malariaparasiten haben einen pH von 5 (Rollo 1968, Ohkuma und Poole 1978, Yayon et al 1984) und sind in der Lage, Chloroquin in höheren Konzentrationen zu akkumulieren (Aikawa 1972). Das ungeladene Chloroquin soll in den Freßvakuolen durch Protonierung akkumulieren und hierdurch den pH erhöhen (Rollo 1968). Diese Erhöhung des pH soll die parasitären Proteasen, die das pH-Optimum im Sauren haben, hemmen und dadurch den Hämoglobinabbau verhindern (Levy et al 1974, Gyang et al 1982, Sherman und Taniogoshi 1983).
Da auch bei längerer Einnahme von Chloroquin keine Nebenwirkungen bekannt sind, die auf eine Beeinflussung lysosomaler Funktionen hinweisen, ist es ebenfalls unwahrscheinlich, daß der Mechanismus der Chloroquin-Wirkung auf Hemmung lysosomaler Enzymen zurückzuführen sein könnte.
Zur Zeit ist die Ferriprotoporphyrin-Chloroquin-Komplex-Hypothese von Fitch und Mitarbeiter (1980) der am meisten diskutierte Mechanismus zur Chloroquin-Wirkung. Es wurde allerdings angenommen, daß der chloroquin-resistente P. berghei kein Hämoglobin abbaut. Hierdurch würden keine FP gebildet und "no ferriprotoporphyrin would be available to form a toxic complex, the parasite would not bind ^{14}C-Chloroquin with high affinity and would be expected to be as resistant as the host to chloroquine" (Fitch 1983).

Vor diesem Hindergrund soll in der vorliegenden Arbeit eine Studie des Hämoglobinabbaus in Chloroquin-resistenten und -sensiblen Plasmodium berghei in vivo durchgeführt werden. Es soll ferner der Versuch gemacht werden, einer Aussage zum Stellenwert des "klassischen Malaria-Pigments" im Zusammenhang mit der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz in der Malaria-Chemotherapie zu machen.

Weiter soll das Schicksal von Chloroquin in parasitierten Erythrocyten bei Chloroquin-resistenten und Chloroquin-sensiblen Plasmodien falciparum in vitro untersucht werden.

2. MATERIAL UND GERÄTE

2.1. Chemikalien

Agarose (IEF)	Pharmacia, Schweden
Ampholine	LKB, Upsala, Schweden
Acrylamid 6-fach umkristallisiert	Biorad, München
Bisacrylamid	Biorad, München
Biliverdindihydrochlorid	Sigma, Heidelberg
Brilllantkresylblau	Merck, Darmstadt
Chloroquindiphosphat	Sigma, Heidelberg
^{14}C-Chloroquin	New England
Coomassie Blau	Sigma, Heidelberg
Desferal (R)	Ciba Geigy, Basel, Schweiz
Dodecylsulfat-Na-Salz	Serva
$^{59}FeCl_3$	Amersham Buchler
Gentamycin	Sigma, Heidelberg
Gelatine	Serva
Giemsa-Färbelösung	Merck, Darmstadt
Hämin	Sigma, Heidelberg
HEPES	Serva
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Serva
Phenazin Methosulfat (PMS)	Sigma, Heidelberg
Phenol pa	Merck, Darmstadt
Percoll TM	Pharmacia, Schweden
Pico-Fluor^{TM} 30	Packard
Protoporphyrin IX(rein)	Serva
RPMI Medium 1640	Gibco

Surfasil	
Sorbitol	Merck, Darmstadt

Alle anderen Chemikalien wurden in der höchsten Reinheitsstufe von der Fa. Merck, Boehringer Mannheim und Serva verwendet.

2.2. Geräte

Digital-pH-Meter 644	Knick
Spektralphotometer ACTA MVI	Beckmann
Photometer PM6	Zeiss
Mikrorapid	Hettich
Rotixa/K	Hettich
Sorvall (RC-5)	Dupont
Ultrazentrifuge TGA 75	Kontron
LS Counter Nr. 68000	Beckmann
Gamma-Counter Nr. 3385	Packard
Linear Analyser LB 282/283	Berthold
Ultraphor 2217	LKB
Kryostat Nr. KT 905	Colora
Powersupply 2197	LKB
Netzgerät 1200/200	Desaga
Volthour Integrator VH-1	Pharmacia, Schweden
Elektrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150	Pharmacia, Schweden
Multiphor 2117	LKB
Forschungsmikroskop	Zeiss
UVIS Universal (254nm, 366 nm)	Desaga
Sauter K 12 Waage	Sauter

Sauter SM 1600	Sauter
Feinwaage 404/13	Sauter
Feinwaage 404/51	Sauter
Trockenschrank	Haereus
Braun Homogenisator Typ 853202	Braun, Melsungen

3. METHODEN

3.1. Haltung der Nagetier-Malaria-Erreger Plasmodium berghei (in vivo)

Als Versuchstiere dienten Sprague Dawley-Ratten aus eigener Zucht. Die Ratten werden in Makrolonkäfigen (2-4 Ratten pro Käfig) von ca. 400 cm^2 Bodenfläche gehalten. Die Raumtemperatur beträgt 23-25° C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von ca. 60 % und einem Tag-Nacht-Rhytmus von 12 Stunden. Alle Tiere erhalten als Standarddiät Altromin^R (Fa. Altrogge, Lage/Lippe) und Leitungswasser ad libitum.

3.2. Plasmodien-Arten und deren Haltung

Für die Versuche werden folgende Stämme von Plasmodium berghei verwendet:

a) P. berghei NK65 (Chloroquin-resistenter Stamm)
b) P. berghei NK65 (Chloroquin-sensibler Stamm)

Die NK65 Stämme erhielten wir freundlicherweise von Herrn Dr. Richards, Wellcome Research Laboratories, Beckenham, UK.

Die Plasmodien werden in Blutpassagen gehalten. Blut von zu 20-30 % parasitierten Ratten wird 1:1 mit Sucrose-Citrat-Medium (SC-Medium: 118 mM Sucrose; 32 mM Natrium-Citrat · $2H_2O$ pH 7,4) verdünnt und den Ratten 0,5 ml i.p. gespritzt.

Bei dem Chloroquin-resistenten Stamm werden die infizierten Ratten täglich mit 137 mg Chloroquindiphosphat pro kg Körpergewicht per Schlundsonde gefüttert (Stammlösung von 13,7 mg/ml und davon 0,1 ml/10 g Tier); dies entspricht 85 mg Chloroquinbase/kg Körpergewicht.

3.3. Blutgewinnung; Parasitierte und nicht parasitierte Erythrocyten (bzw. PE und NE)

Zur Gewinnung der PE und NE werden die Ratten mit Äther getötet, der Brustraum geöffnet und die Hohlvene zwischen Zwerchfell und rechter Herzkammer durchtrennt. Um eine optimale Zellausbeute zu erzielen, wird der Kreislauf zusätzlich durch Einspritzen von SC-Medium in die linke Herzkammer durchgespült. Die gewonnene SC-Blut-Mischung wird dann bei 2 200 g (Hettich; Rotixa/K) bei 4° C 5 Minuten lang zentrifugiert. Die Zellen werden noch zweimal mit Ringerlösung gewaschen (Zentrifugation wie oben).

3.4. Zellfärbung

3.4.1. Giemsafärbung

Ein Tröpfchen Schwanzblut wird auf einen Objektträger gegeben und mit Hilfe eines geschliffenen Ausstrichgläschens gleichmäßig ausgestrichen. Man läßt die Ausstriche an der Luft trocknen und fixiert sie mit Methanol (p.a.).
Zur Parasitämie-Bestimmung werden die Ausstriche mit einer zehnprozentigen Lösung von Giemsa in 100 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0 für 10 Min. gefärbt und anschließend gut mit destilliertem Wasser gespült.

3.4.2. Brillantkresylblau-Färbung

Für die Retikulocyten-Zahl-Bestimmung wird die Brillantkresylblau-Färbemethode herangezogen. Die Objektträger werden über Nacht mit Nitriersäure gereinigt und staubfrei getrocknet. Danach werden sie in 0,5 %-ige wässrige Gelatinelösung getaucht und wieder staubfrei getrocknet. Je ein Tropfen von 1 %-iger Brillantkresylblaulösung in Äthanol (w/v) wird auf dem mit Gelatine beschichteten Objektträger ausgestrichen. Nach dem Trocknen wird ein Tropfen Blut ausgestrichen und der Objektträger sofort in einer feuchten Kammer für 10-15 Minuten inkubiert, getrocknet und anschließend ausgezählt.

3.5. Kultivierung des Human Malaria-Erregers (Plasmodium falciparum) in vitro

3.5.1. Herstellung des Waschmediums

Man löst in wenig bidest. Wasser 20,786 g RPMI-Pulver und 11,88 g HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N-ethanesulfonic acid) in einem 2000 ml-Meßzylinder. Wenn sich alles gelöst hat, werden 4 g Natriumbicarbonat ($NaHCO_3$) und 200 mg Gentamycin zugegeben, gelöst und mit bidest. Wasser erst auf 1000 ml und anschließend auf 2000 ml aufgefüllt, sterilfiltriert (Glasfaserfilter und 0,2 µm Nitrozellulosefilter Millex (R). GV) und in 100- bzw. 200 ml-Portionen aliquotiert und im Kühlschrank (4° C) aufbewahrt (zwei Wochen haltbar).

3.5.2. Das Kulturmedium

Das Kulturmedium enthält 10 % Humanserum

Erythrozyten von Blutgruppe	Serum von Blutgruppe
0	0
A/0	A(AB

Erythrozyten für die Kultivierung:
Unter sterilen Bedingungen und ohne Antikoagulantien wird Blut (30 ml) von einem Spender entnommen und in 8-10 ml Acid Citrate Dextrose (ACD) gegeben und bei 4° C aufbewahrt (zwei bis drei Wochen haltbar).
Herstellung des ACDs:
Citronensäure (4,4 g); Natriumcitrat · $2H_2O$ (13,2 g); Glucose (14,7 g) ad 1000 ml bidest. Wasser.

3.5.3. Serumgewinnung zur Kultivierung

500 ml Blut werden vom Spender steril abgenommen (Blutbank), zwei Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen, für wei-

tere 2-12 Stunden bei 4° C (Kühlschrank, Kühlraum) gelagert und anschließend zentrifugiert (2000 UpM für 15 Minuten). Man nimmt das Serum steril ab und zentrifugiert mehrmals, bis es frei von restlichen Erythrocyten ist. Der so gewonnene Serumpool wird in 10 ml bzw. 20 ml Portionen aliquotiert und eingefroren (-20° C bis -40° C).

3.5.4. Die Malaria-Kultur

3.5.4.1. Waschen des Bluts

Das ACD-Vollblut (1:4) wird vorsichtig, aber gründlich vermischt und 2 ml in ein steriles Einmalreagenzglas (Plastik) gegeben. Dazu werden 5 ml Wasch-Medium gegeben, gut vermischt und bei 2000 - 2500 UpM (800 - 1200 g; Minifuge GL von Heraeus Christ) und 5° C - 10° C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wird das Pellet in 10 ml Wasch-Medium resuspendiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Man wiederholt den Waschvorgang noch zweimal. Es ergibt ein Zellvolumen von etwa 1 ml.

3.5.4.2. Infizieren der gewaschenen Erythrocyten

Aus einer Kulturschale mit höherer Parasitämie (10 %) werden soviel Zellen zum Infizieren entnommen, daß die neu anzulegende Kultur eine Anfangs-Parasitämie von 0,5 - 1 % hat. Man bringt das Volumen vom frisch infizierten Blut mit Kultur-Medium auf 10 ml. Nachdem die Zellen gründlich vermischt sind, werden sie in neuen Petrischalen (Falcon^{R} 3046 von Becton Dickinson Labware, Oxinard) zum gewünschten Hämatokrit (5 %) verteilt. Anschließend bringt man das Volumen auf 10 ml mit Kultur-Medium und inkubiert bei 37° C.

3.5.4.3. Kultivierung der infizierten Erythrocyten (Nach Trager and Jensen 1976)

Die Petrischalen werden zusammen mit einem brennenden Teelicht in einen Exsikkator gestellt. Man schließt den Exsikkator

mit dem Deckel, läßt aber den Hahn offen, bis die Kerze verloschen ist. Dann schließt man den Hahn.
Alle 24 Stunden wird das Kulturmedium gewechselt; das alte Medium wird vorsichtig abgesaugt, ein Ausstrich von der Kultur gemacht und anschließend 10 ml frisches Medium dazu gegeben und in den Brutschrank gebracht.

3.5.4.4. "Splittieren" der Kultur

Bei einer Parasitämie von 8 bis 10 % wird die Kultur nach dem Mediumwechsel "splittiert"; das ACD-Vollblut wird gewaschen (wie unter 3.5.4.1.), mit Material einer zu splittierenden Kultur infiziert (wie unter 3.5.4.2.) und kultiviert wie unter 3.5.4.3.

3.6. Synchronisation

Für chemotherapeutische Untersuchungen ist es notwendig zu wissen, welches Stadium des Parasitenwachstums beeinflußt wird. Synchronisation dient dazu, daß man selektiv ein bestimmtes Stadium der Parasiten untersuchen kann.

3.6.1. Sorbitol-Behandlung
(Nach Lambros and Vanderberg 1979)

Für ein synchronisiertes Zellwachstum wird die Kultur bei 200 g und 10° C für 5 Minuten zentrifugiert.
Das Pellet wird mit dem fünffachen Volumen an 5 % Sorbitol (sterilfiltriert) versetzt und 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wird nochmals wie oben zentrifugiert, mit Kultur-Medium versetzt und kultiviert (3.5.4.1. bis 3.5.4.3.).

3.6.2. Gelatine-Behandlung
(Nach Jensen and Trager 1978)

Eine 1-3 %-ige Gelatinelösung in RPMI 1640 wird sterilfiltriert. Kulturen von P.falciparum mit Parasit-

ämien von 10 bis 12 % werden bei 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes (Kultur-Medium) wird das Pellet in Gelatine-RPMI 1640 zu einem 10%-igen Hämatokrit suspendiert und bei 37°C (Wasserbad) für 30 Min. inkubiert. Der Überstand, der Trophozoiten und Schizonten enthält, wird abpipettiert und bei 400 g und Zimmertemperatur für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit Kultur-Medium gewaschen und weiter kultiviert (s. 3.5.4.2. und 3.5.4.3.).

3.7. Kryopreservierung von Plasmodium falciparum

3.7.1. Lösungen

a) Zum Einfrieren: Zu 180 ml 4,2 % Sorbitol-(Manitol)-Lösung in 0,9 % Kochsalz-Lösung gibt man 70 ml Glycerin(pa). Die resultierende Lösung (28 % Glycerin, 3 % Sorbitol, 0,65 % NaCl) wird sterilfiltriert (Millipore)

b) Zum Auftauen: 3,5 g NaCl wird in 100 ml Quarz-destilliertem Wasser gelöst (Hypertone Kochsalz-Lösung) und anschließend autoklaviert.

3.7.2. Einfrieren der Zellen

Das Kultur-Material wird bei 400 g und 5° C für 10 Minuten zentrifugiert (Heraeus Christ, Minifuge GL) und der Überstand abgesaugt. Die Zellen werden mit den gleichen Volumen Einfrierlösung (s.o.) resuspendiert. Man aliquotiert die Zellsuspension in 0,5 ml Portionen in NUNC-Röhrchen, taucht diese schnell in ein Trockeneis-Alkohol-Bad von -40°C und bewahrt sie anschließend in flüssigem Stickstoff auf.

3.7.3. Auftauen der Zellen

Das NUNC-Röhrchen wird zum Auftauen mit gelockertem Schraubdeckel ins Wasserbad (37° C) gestellt. Die aufgetaute Zellsuspension wird in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen pipettiert und 7 Minuten bei 500 g und 5° C zentrifugiert. Die Zellen

werden dann in dem gleichen Volumen hypertoner Kochsalz-Lösung (3,5 %, w/v) resuspendiert und 7 Minuten wie oben zentrifugiert. Anschließend wäscht man die Zellen zweimal mit Kultur-Medium, resuspendiert sie im gleichen Volumen Kulturmedium und gibt sie zum 5-10-fachen Volumen einer 50 %-igen Erythrocytensuspension. Zu je 1 ml infizierter Erythrozytensuspension gibt man 5 ml Kulturmedium und pipettiert 1,5 ml in 3,5 cm Petrischalen. Anschließend inkubiert man die Zellen wie unter 3.5.4.3.

3.8. Parasitenisolierung durch Lektinvernetzung

Bei physiologischem pH kristallisiert Ratten-Hämoglobin sehr leicht aus. Um dieses technische Problem zu umgehen, werden für die Parasitenisolierung NMRI-Mäuse mit dem entsprechenden Plasmodium berghei Stamm (CS/CR) infiziert.
Bei einer Parasitämie von etwa 30 % wird das Blut in SC-Medium aufgenommen und einmal bei 1400 g und 4° C für 5 Minuten in der Hettich-Zentrifuge (Rotixa/K) zentrifugiert. Das Pellet wird in Calcium-Ringer (Ringer-Lösung + 10 mM $CaCl_2$) aufgenommen und zweimal wie oben zentrifugiert.

Vernetzung der Erythrocyten

Zur Vernetzung der Erythrozyten werden ein paar Tropfen gekühlter konzentrierter Lektin-Lösung auf die Wand des schräggehaltenen Zentrifugenglases gegeben und durch Drehen des Glases verteilt, so daß sie sich langsam mit den Erythrocyten mischen. Man wiederholt die Lektin-Zugabe bis zur völligen Aggregation der Zellen und gibt danach Calcium-Ringer zum Auswaschen des überschüssigen Lektins zu, läßt die Zellen sich absetzen und saugt den Überstand ab. Man wiederholt den Waschvorgang mit Calcium-Ringer.
Danach werden die Zellen wieder in Calcium-Ringer aufgeschwemmt und bei 48 000 g (Sorvall; RC-5 Rotor SS 34) und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert.

Scheren der Zellen

Die gepackten Zellen werden mehrmals in eine Eimal-Spritze aufgezogen und ausgespritzt. Man wiederholt den Vorgang, nachdem man die Spritze mit einer 1-er-Kanüle versehen hat, bis zur völligen Freisetzung der Parasiten.
Das Blut-Parasiten-Gemisch wird mit Ringer aufgefüllt und bei 250 g (5 % Hettich-Zentrifugation) und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird bei 2 200 g (100 % Hettich-Zentrifugation) und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Die so gewonnenen Parasiten werden je nach Vorhaben in Lyse-Lösung (T_4/T_2 für IEF) bzw. Lyse-Puffer (für Enzymmessungen) lysiert.
Lyse-Lösungen: (T_4 und T_2) 10 mM $MgCl_2$, 10 mM α-Mercaptoäthanol, 4 mM EDTA, 4% (2 % für T_2) Triton X 100 und 75 % Glycerin.
Lyse-Puffer: 10 mM KPP, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 10 mM α-Mercaptoäthanol, 2 % Triton X 100 und 8,7 % Glycerin.

3.9. Enzym-Messungen

3.9.1. Bestimmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.149)

Das Enzym diente in dieser Arbeit als erythrozytäres Leitenzym. Es katalysiert die Umwandlung von Glucose-6-Phosphat zu 6-Phosphat-Gluconat mit der Entstehung von NADPH, dessen Zunahme bei 340 nm gemessen wird (Mod. Loehr und Waller, 1970).
Reaktionspuffer: 150 mM Kaliumphosphat Puffer (KPP), pH 7,4
1 mM EDTA und 10 mM $MgCl_2$

Testansatz (Gesamtvolumen 1000 ml)

Lösungen	Vol. im Test	Konz. im Test (mM)
Puffer	895 - 850	134 - 127
Probe (NE, PE)	5 - 50	
5 mM $NADP^+$	50	0,25
5 - 10 Minuten Vorinkubation bei 37° C und 340 nm		
16 mM G6P	50	0,8

3.9.2. Bestimmung der $NADP^+$-abhängigen Glutamat-Dehydrogenase (EC. 1.4.1.4) (Mod. nach Schmid 1970)

Das Enzym katalysiert folgende Gleichgewichtsreaktion:

$$\alpha\text{-KG} + NH_4^+ + NADPH \rightleftharpoons Glu. + NADP^+ + H_2O$$

Das Gleichgewicht der Reaktion liegt auf der Seite von Glutaminsäure.

Reaktionspuffer:

150 mM KPP pH 7,4
2 mM EDTA und 10 mM $MgCl_2$

Testansatz (Gesamtvolumen 1000 µl)

Lösungen	Vol. im Test	Konz. im Test (mM)
Puffer	750	112,5
Probe	50	
3,9 mM NADPH	50	0,195
100 mM α-KG	100	10,0
5 Minuten Vorinkubation bei 37° C und 340 nm		
2M NH_4Cl	50	100

3.9.3. Bestimmung der Hämoxygenase (EC. 1.14.99.3)

Substrat: Hämalbumin; Herstellung nach Tenhunen et al 1968. 13 mg Hämin werden in 2,5 ml 0,1M NaOH, die 12 mg Tris enthalten, gelöst. Danach wird 5 ml 2 %-ige Humanalbumin-Lösung zugegeben und der pH mit 1M HCl auf 7,4 eingestellt.

Eisen-Chelator: Hierzu diente Desferrioxamin B (Desferal$^{(R)}$, Ciba Geigy) ein Produkt des Actinomyceten Stretomyces pilosus. Die Bindungskonstante für Eisen-III beträgt 10^{31} (Kerbele 1964, Moeschlin et al 1962). Man stellt eine Stammlösung von 3 mg/ml Desferal mit 100 mM KPP pH 7,4 ein.

Homogenisationslösung: 100 mM KPP, 250 mM Sucrose, 10 mM $MgCl_2$; pH 7,4

Mikrosomen- und 100 000 g-Überstand-Präparation: Vier weibliche Ratten (150-250 g) werden über Nacht nüchtern gesetzt. Sie werden mit Äther getötet und die Lebern mit kalter Homogenisationslösung perfundiert. Die Lebern werden mit einer Schere zerkleinert und zum Pottern mit dem 3-fachen des Lebergewichts an Homogenisationslösung (w/V) versetzt. Zum Pottern wird ein motor-getriebener (B. Braun Type 853202) Potter-Elvehjem-Homogenisator verwendet.
Das Homogenat wird sofort bei 2 200 g (r = av) und 4° C für 5 Minuten in der Hettich-Zentrifuge (Rotixa/K) zentrifugiert.
Der Überstand wird in der Sorvall-Zentrifuge bei 48 000 g und 4° C für eine halbe Stunde zentrifugiert. Der postlysosomale Überstand wird anschließend in der Kontron Ultrazentrifuge (Beckmann, TGA) bei 100 000 g (r = av) zentrifugiert. Die Mikrosomen werden in Homogenisationslösung aufgenommen.
Die Hämoxygenaseaktivität wird durch Messung der Freisetzung von dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) aus Hämin (Ferriprotoporphyrin : FP) mit Desferrioxamin B bei 400 nm (Absorptionsmaximum von Fe^{3+}-Desferrioxamin B Komplex) gemessen.
Der 100 000 g-Überstand diente als Quelle für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) und Biliverdin-Reduktase.

Testansatz (1000 µl Gesamtvolumen)

Lösungen	Vol. im Test (µl)	Konz. im Test
100 mM KPP	650	65 mM
80 mM G6P	50	4 mM
Desferal (3mg/ml)	50	150 µg/ml
16 mM $NADP^+$	50	0,8 mM
Mikrosomen	100	3-6 mg Protein/ml
100 000 g Überstand	50	7-10 µg Protein/ml
Vorinkubation bei 37° C für 5-10 Minuten		
2,5 mM Hämin, Albumin	50	125 µM

3.9.4. Bestimmung der Biliverdin-Reduktase (EC. 1.3.1.24) (Mod. Singelton et al 1965)

Stammlösung: Biliverdin; 3,5 mg Biliverdin werden in 0,2 ml 1M NaOH gelöst und mit 0,1M KPP pH 7,4 auf 3,5 ml aufgefüllt.

Herstellung des 100 000 g-Überstandes: Wie unter 3.9.3. beschrieben. Die Enzymreaktion wird mit dem Beckman Photometer (ACTA MVI) bei 37° C und 670 nm/460 nm gemessen.

Testansatz (1000 µl Gesamtvolumen)

Lösungen	Vol. im Test	Konz. im Test (ml)
100 mM KPP	850	85 mM
Probe	50	
Biliverdin (1mg/ml)	50	0,05
Vorinkubation bei 37° C für 5 Minuten		
0,90 mM NAD(P)H	50	0,045

3.9.5. Bestimmung der Catalase (EC. 1.11.1.6.)
(Mod. Beutler, 1975)

Catalase katalysiert folgende Reaktion:

$$2H_2O_2 \dashrightarrow 2H_2O + O_2$$

Die Geschwindigkeit, mit der Catalase das Wasserstoffperoxid zerlegt, wird bei 240 nm gemessen.

Puffersystem: 100 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 8,00

Testansatz (Gesamtvolumen 1000 µl)

Lösungen	Leerwert (µl)	Probe (µl)
Puffer	50	50
10 mM H_2O_2	-	50
H_2O	930	30
Vorinkubation bei Raumtemperatur und 230 nm		
Lysat/Probe	20	20

3.10. Aktivitätsanfärbung

Die Aktivitätsanfärbung dient dazu, parasitäre Enzyme von denen der Wirtzelle zu unterscheiden. Sie wird direkt angewandt in alllen $NAD(P)^+$-abhängigen Enzymreaktionen. Es ist auch möglich, durch gekoppelte Test-Systeme $NAD(P)^+$/NAD(P)H-unabhängige Enzymreaktionen zu untersuchen.

Das Prinzip der Aktivitätsanfärbung beruht darauf, Reduktionsäquivalente von erzeugtem NAD(P)H über Phenazin-Methosulfat (PMS) auf Nitro-Blau-Tetrazoliumsalz (NBT) zu übertragen. Während der Reduktion geht die oxidierte Form der NBT (gelb) in die wasserunlösliche reduzierte Form (blau) über (Abb.6).

Die zu untersuchenden Proben werden nach ihren isoelektrischen Punkten auf einem Agarose-Gel (pH 3-10) getrennt. Ein zurecht-

geschnittener Auftragestreifen wird mit der Substrationslösung, die PMS und NBT enthält, getränkt, auf das Gel gelegt und bei 37° C inkubiert, bis der gewünschte Grad der Farbentwicklung erreicht ist. Um eine nicht-enzymatische Abfärbung zu unterscheiden, wird jeweils eine Kontrollanfärbung ohne Substrat durchgeführt.

Testansätze (Mod. nach Carter, 1978)

3.10.1. Lactat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.27)

In 2;0 ml 0,05 Tris-HCl pH 8,0 werden 200 mg Na-Lactat, 5 mg NAD^+, 5 mg NBT und anschließend 0,5 mg PMS gelöst.

3.10.2. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (EC. 1.1.149)

Man löst in 2,0 ml Tris-HCl 50 mg G6P, 5 mg $NADP^+$, 0,5 mg NBT und 0,05 mg PMS.

3.10.3. 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (EC. 1.1.1.44)

50 mg Na-6-Phosphogluconat, 5 mg $NADP^+$, 5 mg NBT und anschließend 0,5 mg PPMS werden in 2,0 ml Tris-HCl pH 8,0 gelöst.

3.10.4. Glucosephosphat-Isomerase (EC. 5.3.1.9.)

In 20 ml Tris-HCl pH 8,0 werden 50 mg diNatrium-Fructose-6-Phosphat, 5 mg $NADP^+$, 5 mg NBT, 20 mg MgC12,0,01 ml G6PDH und anschließend 0,5 mg PMS gelöst.

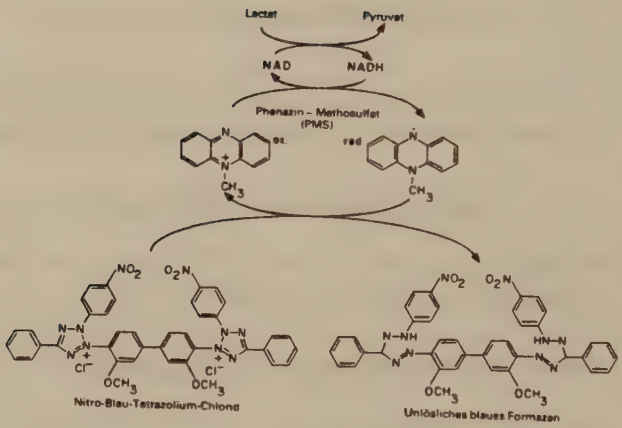


Abbildung 6: Reaktionsprinzip der Aktivitätsfärbung. Beispiel: Kopplung der Oxidation von Lactat mit der Reduktion von p.Nitroblau-Tetrazolium-Chlorid.

3.11. Untersuchungen zum Hämoglobinabbau

3.11.1. In vivo-Markierung von Ratteneryhtrozyten mit 59-Fe (Unterdruckbehandlung) (Mod. nach Rüssmann (1978) in der Apparatur nach Treumer (1983))

Zur Stimulierung der Erythrozyten werden Ratten in einem Unterdrucksystem vier Tage lang gehalten. Die Druckminderung erfolgte graduell. Der Luftdruck am ersten und an den folgenden drei Tagen war 650 mbar, 550 mbar, 450 mbar und 420 mbar.
Ab dem zweiten Tag der Unterdruckbehandlung werden je Ratte über 3 Tage jeweils 50 µCi radioaktives Eisen (^{59}Fe) als Citrat intraperitonal gespritzt.
Um Gewichtsverlust zu vermeiden, wird der Exsikkator nach jeweils 24 Stunden für eine Stunde geöffnet, wobei man die Ratten fressen und trinken ließ.
Nach der ersten Applikation von Eisen-59 wird zu folgenden Zeiten: 30 Min., 60 Min., 90 Min., 150 Min. und danach stündlich bis 12,5 Stunden Blut in Hämatokritröhrchen entnommen und 5 Minuten in der Mikro-Rapid-Zentrifuge (Hettich) zentrifugiert. Die Hämotokritröhrchen werden an der Grenze zwischen Erythrocyten und Serum getrennt und separat im gamma-Counter (Parker) ausgezählt. Danach wird das Volumen der gepackten Erythrocyten bestimmt und mit derselben Menge Lyselösung (T_4: 10 mM $MgCl_2$, 10 mM α-Mercaptoäthanol, 4 mM EDTA, 4 % Triton X-100 und 75 % Glycerin) lysiert. Anschließend werden die Proben auf der Isoektrischen Fokussierung aufgetrennt. Die Auswertung der Fokussierungsgele erfolgt durch Autoradiographie, und die quantitative Auswertung der Radioaktivitätsverteilung wird mit einem ortsempfindlichen Proportionalzählrohr (Linear Analyzer LB 282/283 Berthold, Wildbad) durchgeführt.

3.11.2. Vergleichender Abbau des Hämoglobins in mit Chloroquin-resistenten und Chloroquin-sensiblen P.berghei infizierten Rattenerythrocyten

Gleich nach der Beendigung der Eisen-59-Markierung werden die Ratten in zwei Gruppen geteilt (Abb. 7). Eine Gruppe wird mit einem Chloroquin-sensiblen P. berghei Stamm i.p. infiziert und die andere mit dem Chloroquin-resistenten Stamm (P. berghei NK 65). Nach dem Erreichen von Parasitämien zwischen 20 und 60 % werden die Ratten unter "Blutgewinnung " (3.3.) beschrieben behandelt. Das gewonnene Blut wird nach dem Grad der Parasitenreife (Blutschizogonie) aufgetrennt (3.12.) und der Gradient in 2 ml Portionen fraktioniert. Man wäscht die Zellen mit0,9 % NaCl bis das Percoll ausgewaschen ist. Die Proben werden 1:1 mit Lyse-Lösung (T4/T2) lysiert und wie in 3.13. und 3.14. beschrieben in einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt und wie in 13.11. und 13.15. ausgewertet.

3.12. Isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation (Percoll-Gradient)

Es werden folgende Stammlösungen hergestellt:

1) 10-fach Sucrose-MOPS: 2 M Sucrose, 440 mM MOPS, 10 mM $MgCl_2$ und 1 % Glucose (w/w) pH 7,33
   Mit dem 10-fachen Sucrose-MOPS werden die Iso-MOPS- (ca.300 mOsm) und die Iso-Percoll (300 mOsm)-Lösungen hergestellt.

a) Iso-MOPS: 25,57 g (20 ml) 10-fach Sucrose-MOPS-Puffer wird auf 200 ml mit destilliertem Wasser gebracht.
b) Iso-Percoll: 25,57 g (20 ml) 10-fach Sucrose-MOPS-Puffer werden mit Percoll auf 200 ml gebracht.

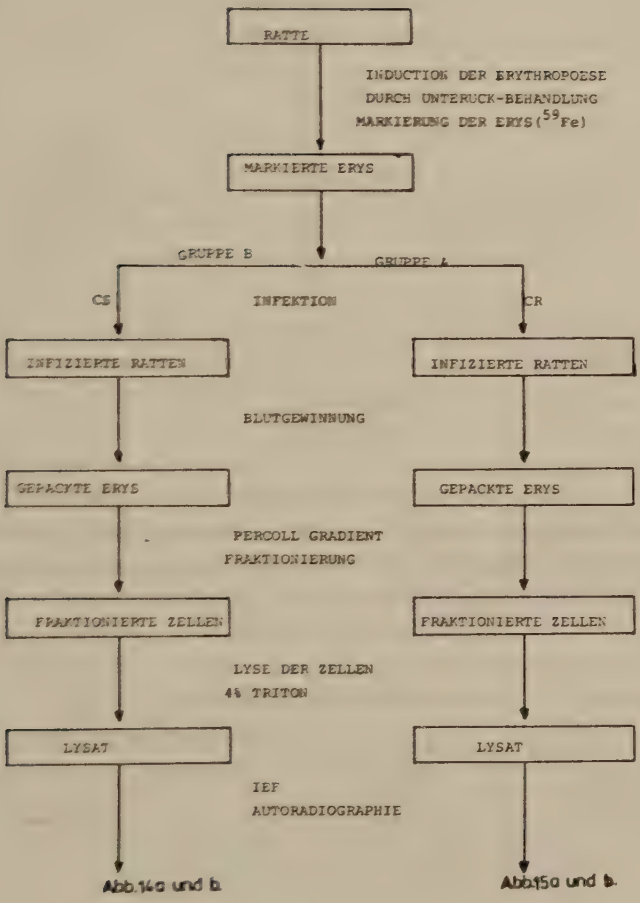
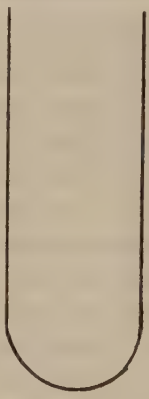


Abbildung 7: Experimentelles Vorgehen bei der Markierung der Ratterierythrozyten mit Eisen-59 und die anschließende Untersuchung zum Hämoglobinabbau

Tabelle 1: Pipettierschema des Percoll-Gradienten

Stufen	Zent.-Röhrchen	Auftrag (g)	Iso-Percoll (g)	Iso-MOPS (g)
IV		8	5	5
III		8	6	4
II		8	7,25	3
I		8	7,84	2
Zell-Schicht		8		



Die Stufen des Gradienten werden wie in Tabelle 1 aus Isopercoll und Iso-MOPS hergestellt. Die Stufen werden in abnehmender Dichte von unten nach oben auf der Waage übereinandergeschichtet. Das Blut wird wie unter "Blutgewinnung" (3.3.) vorbereitet und anschließend zweimal mit Iso-MOPS gewaschen. Auf 1,5 g gepackte Zellen werden jeweils 6,5 g Iso-Percoll zugegeben und gut durchmischt. Danach werden pro UZ-Röhrchen 8 g der Zell-Isopercoll-Mischung dem Gradienten unterschichtet. Nach dem Austarieren der Röhrchen mit der Stufe niedrigster Dichte werden diese bei 1 500 g (SW-27, r=av.) und 4° C mit dem Laufprogramm "reorientation-Gradient" zentrifugiert (Beckmann Ultrazentrifuge).

3.13. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

3.13.1. Vorbereitung der Platten

Auf die Glasplatte ohne Abstandhalter werden ca. 2 ml Wasser gegossen und das Gel-Bond mit der hydrophoben Seite nach unten aufgewalzt. Danach wird die zweite Platte mit Gummiab-

standhaltern nach einer Oberflächenbehandlung mit Surfasil darauf gelegt und mit Klammern zusammengedrückt. Die Konstruktion wird mit Hilfe eines Wärmeblocks aus Aluminium, der 30° geneigt und mit feuchtem Filterpapier bedeckt ist, auf ca. 70° C gehalten.

3.13.2. Agarose IEF

150 mg Agarose (IEF, Pharmacia) und 1,8 g Sorbit werden in 13 ml bidest. Wasser aufgenommen, bei 100° C gelöst und anschließend in einem auf 75° C thermostatisierten Wasserbad abgekühlt.
300 µl Triton-X-100 (superpure, für Gaschromatographie) werden hinzugegeben und ein paar mal mit einer 20 ml-Spritze aufgezogen. Anschließend werden 1 ml steril entnommene Ampholine hinzugefügt und gut durchmischt und alles auf 15 ml aufgefüllt. Die 20 ml-Spritze wird auf einem Wasserbad warmgehalten. Die Agarose wird dann sofort in die Spritze luftblasenfrei aufgezogen und in die aufdem Alublock warmgehaltene Gelkassette gegossen. Nach dem Abkühlen bei Raumtemperatur wird das Gel in einer feuchten Kammer im Kühlraum bei 4° C aufbewahrt.

3.13.3. Auftragen der Probe und Trennung

Es werden für die hier in Betracht kommenden Proben (Erythrozyten-Lysat und Serum) je 5 µl ohne Luftblasen aufgetragen. Die Proben werden - je nachdem - mit Lyselösung T-2 oder T-4 im Verhältnis von 1:1 (v/v) lysiert und eingefroren aufbewahrt. Nach dem Auftragen werden die Gele bei 1500 V/15 W für zwei bis zweieinhalb Stunden lang (2000 Volt Stunden) fokussiert. Als Kathoden- bzw. Anoden-Lösung wurde 1N NaOH bzw. 0,05M H_2SO_4 genommen.

Behandlung des Gels nach der isoelektrischen Fokussierung
Die Gele werden sofort für 1 Stunde (ausgenommen Eisen-59-Gele) in einer Fixierlösung (10 % TCA (w/v), 1 % Sulfosalicyl-

säure (w/v)) fixiert und mehrmals mit einer Lösung von Äthanol:Essig:Wasser (35%:10%:55%) gewaschen, bis das Gel transparent wird. Das Gel wird dann sofort im Luftstrom getrocknet und anschließend gefärbt (3.14.2.1.). Die Eisen-59-Gele werden nach der isoelektrischen Fokussierung, sofort in einem Luftstrom getrocknet und autoradiographiert (3.15.).

3.14. Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Mod. nach Laemmli, 1970)

Für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden folgende Stammlösungen hergestellt:

A) 30 % (w/v) Acrylamid + 0,8 % (w/v) N-N'-Methylen-bisacrylamid
B) 1,5 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8
C) 10 %-ige (w/v) SDS-Lösung
D) 0,5 M Tris-HCl-Puffer pH 6,8

Probenpuffer: 2 ml 20 %-ige (w/v) Lithiumdodecylsulfat(LiDS)-Lösung in dest. Wasser.
2 ml 87 %-iges (w/v) Glycerin, 1 ml 2-Mercapto-äthanol und 1,25 ml 1M Tris-HCl-Puffer pH 6,8

Elektrodenpuffer: 3 g Tris, 14,4 g Glycerin und 10 ml 10 %-ige SDS-Lösung ad 1000 ml mit dest. Wasser pH 8,8

Probenvorbereitung: Alle Proben werden in Probenpuffer für 10 Minuten gekocht und tiefgefroren aufbewahrt.

3.14.1. Herstellung des Gels

Es wird hier ein 5-20 %-iges logarithmisches Trenngel verwendet.

a) Pipettierschema für die 5 %-ige Lösung:

Lösungen	Volumen (ml)
A	3,3
B	5,0
H_2O	11,3
entgasen	
C	0,2
TEMED	0,015 (15µl)

Anschließend werden 66 µl (frisch angesetztes) 10 %-iges (w/v) Ammoniumpersulfat hinzugefügt.

b) Piptettierschema für die 20 %-ige Lösung:

Lösungen	Volumen (ml)
A	10,0
B	3,75
H_2O	1,0
entgasen	
C	0,15 (15µl)
TMED	0,01 (10µl)

Anschließend wird 50 µl Ammoniumpersulfat (10 %-iges (w/v)) hinzupipettiert.

Die wie oben angesetzten Lösungen werden filtriert und die 20 %-ige Lösung in den Gradientenmischer gegeben. Die 5 %-ige Lösung wird in eine Spritze aufgezogen und über eine Gradientenpumpe (Precidor 5003) bei voller Geschwindigkeit in den Gradientenmischer gepumpt, wosie mit der 20 %-igen Lösung vermischt und kontinuierlich in die Gelkassette abgeführt wird. Das Trenngel wird überschichtet mit wassergesättigtem Butanol und stehen gelassen bis zur Polymerisation.

Nach der Polymerisation des Trenngels wird das Sammelgel (3 % Polyacrylamid, 0,1 % SDS) wie folgt angesetzt:

Lösungen	Volumen (ml)
A	1,5
H_2O	9,4
D	3,75
Entgasen	
C	0,15 (150µl)

Nach dem Absaugen der wassergesättigten Butanol-Lösung werden die vier Komponenten gemischt und 1 ml davon zum Spülen der Oberfläche des Trenngels verwendet. Danach werden zu den gemischten Komponenten 18,75 µl TEMED und anschließend 150 µl 10 %-ige Ammoniumpersulfat zugegeben. Die so zusammenpipettierten Lösungen werden filtrierend dem Trenngel überschichtet und bis zur Polymerisation stehen gelassen. Die Elektrophorese erfolgt bei 300 V (22W) unter Wasserkühlung für 2,5 Stunden.

3.14.2. Gelfärbungen

Für die Analyse der Elektrophoresen werden zwei Färbemethoden angewandt:

a) Coomassieblue-Färbung b) Silberfärbung

3.14.2.1. Coomassiefärbung (Mod. König et al 1970)

Die Gele werden zuerst in 10 % TCA, 0,1 % Sulfosalicylsäure für 45 Minuten fixiert. Danach werden sie gründlich in Entfärbelösung (35 % Äthanol, 10 % Essigsäure) gewaschen. Der Waschvorgang wird mehrmals wiederholt, bis das Gel durchsichtig wird (Auswaschen der Ampholyte für bessere Färbung). Anschließend wird das Gel sofort im Luftstrom getrocknet. Nach dem Trocknen wird das Gel in 0,4 %-ige Coomassieblue-Lösung (in Entfärbelösung) gefärbt, anschließend mit Entfärbelösung entfärbt und getrocknet.

3.14.2.2. Silberfärbung (Mod. Oakley et al 1980)

Herstellung der Silberlösung:
Die Silberlösung besteht aus 2 g Silbernitrat, 70 ml dest. Wasser, 3,5 ml Ammoniak (konzentriert), 50 ml 0,36 % NaOH und 120 ml Methanol.
Man löst die angegebene Menge Silbernitrat in dest. Wasser und gibt tropfenweise und unter Rühren 3,5 ml konzentrierten Ammoniak dazu (dabei entwickelt sich eine braune Färbung, die gegen Ende der Titration verschwindet).
Danach gibt man 50 ml 0,36 % NaOH dazu und schließlich 120 ml Methanol. Die Reihenfolge muß eingehalten werden.

Herstellung der Entwicklerlösung:
Man löst 50 mg Citronensäure · $1H_2O$ in dest. Wasser, gibt kurz vor Gebrauch 0,5 ml Formaldehyd dazu und bringt das Volumen mit Wasser auf 100 ml.

Stopbad: 50 % Methanol und 5 % Natriumthiosulfat.

Das Gel wird in der Silberlösung für 1 - 1,5 Stunden inkubiert und danach für etwa 8 Minuten (für 1 mm Gele) mit destilliertem Wasser gewaschen. Das Wasser wird bei diesem Vorgang mehrmals gewechselt. Es diente dazu, überschüssiges Silber effektiv auszuwaschen und dadurch Hintergrund-Färbung zu verringern, ohne daß die Proteinfärbung beeinträchtigt wird. Nach dem Waschen wird das Gel kurz mit Entwickler-Lösung nachgewaschen und anschließend neuer Entwickler dazugegeben und solange entwickelt, bis die gewünschte Banden(Protein)-Färbung auftritt. Man saugt den Entwickler ab und stoppt die Färbereaktion mit dem Stopbad. Das gefärbte Gel wird mit 50 % Methanol mehrmals gewaschen und anschließend getrocknet.

3.15. Autoradiographie

Das getrocknete Gel wird mit Klarsichtfolie luftblasenfrei abgedeckt. Das so abgedeckte Gel wird dann in der Kassette auf einen Röntgenfilm gelegt und in der Dunkelkammer exponiert.
Nach der Exposition wird der Film mit Kodak D19 für 5 Minuten entwickelt, gestoppt mit 2 % Essigsäurelösung (2 Minuten) und solange fixiert, bis der Hintergrund nicht mehr klarer wird. Anschließend wird 2 Stunden gewässert und zum Trocknen aufgehängt.

Entwickler: Kodak D19
In 500 ml dest. Wasser werden gelöst: Teil A (4,939 g) und Teil B (70,7 g)

Fixierer:
200 g Na-Thiosulfat und 20 g Na-bisulfit werden in ad 1 000 ml dest. Wasser gelöst.

3.16. Hämatinbestimmung

Zur Hämatinbestimmung werden zwei Methoden verwendet.

3.16.1. Alkalische Extraktion

Extraktionslösung: 80 % KOH in Äthanol
20 µl Vollblut wird aus dem Schwanz entnommen und in 1 ml Extraktionslösung gevortext und anschließend bei 2 200 g und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert (Hettich Rotixa/K). Im Überstand wird die Extinktion bei 400 nm für verdünnte Proben, und bei 600 nm für konzentrierte Proben gemessen.

3.16.2. Phenolextraktion (Rimington et al 1947)

Extraktionslösung: 90 % Phenol (w/v)
Auf je 90 g Phenol wird 10 ml dest. Wasser gegeben und in einem Wasserbad leicht erwärmt. Dies wird zur Pigmentextraktion

von Geweben (Milz und Leber) verwendet; die Extinktion wird bei 400 nm / 600 nm gemessen.

3.17. Malaria-Pigment

3.17.1. Giemsa-Färbung des Malaria-Pigments aus Milz und Leber

Die Ratte wird wie unter 3.3. beschrieben behandelt. Die Spülung des Kreislaufs wird so lang wiederholt, bis der Austritt von Hämoglobin minimal wird. Danach wird die Leber mit SC-Medium oder Ringer perfundiert. Durch das Gewebe werden glatte Schnitte gemacht, und auf Zellstoff getupft (um restliche Blutzellen zu entfernen). Nach der Fixierung mit Methanol (p.a.) werden die Ausstriche für eine Stunde mit 10 %-iger Giemsa-Lösung eine Stunde lang gefärbt und danach lichtmikroskopisch betrachtet.

3.17.2. Isolierung des Malaria-Pigments aus P. berghei infizierten Erythrocyten

Die PE werden zunächst in SC-Medium aufgenommen und bei 1 600 g und 4° C in der Hettich-Zentrifuge (Rotixa/K) über 2 Minuten zentrifugiert. Danach werden die Zellen in viel Ringer aufgenommen und bei 2 000 g wie oben zentrifugiert. 1 ml gepackte PE werden in 20 ml Lyse-Lösung (4 % Triton X-100 in dest. Wasser) lysiert und in der Sorvall-Zentrifuge bei 48 000 g und 10° C für 30 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird nochmals in destilliertem Wasser aufgenommen, kräftig gemischt und in der Sorvall-Zentrifuge wie oben zentrifugiert. Das daraus resultierende Pellet wird 1:1 in Lyse-Lösung aufgenommen und anschließend in einer isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt. Die Auftragsplättchen werden anschließend in 0,5 - 1 ml alkalischer Extraktionslösung gegeben, von Zeit zu Zeit bis zur völligen Extraktion kräftig geschüttelt und anschließend bei 2 200 g und 4° C für

5 Minuten zentrifugiert. Im Überstand wird die Extraktion bei 600° bzw. 400 nm gemessen. Als Kontrolle dienen nicht infizierte Erythrozyten.

3.17.3. Lyse mit destilliertem Wasser

Gewaschene Zellen (NE/PE) werden bei Zimmertemperatur langsam und unter Rühren in dest. Wasser (1 ml gepackte Zellen : 50 ml H_2O) hineingetropft. Es wird über 30 Minuten weiter gerührt und dann werden die Zellen wie in "Lyse mit Triton X-100" (3.17.2.) weiter bearbeitet.
Als Maßstab der Effektivität der Lyse werden die Leitenzyme, G6PDH (erythrocytäres) und $NADP^+$-GLDH (parasitäres) in den aus den einzelnen Zentrifugationsüberständen gemessen.

3.18. Analyse des Ratten-Serums im Ablaufe der Parasitämie

Vor der Infektion der Ratten mit den entsprechenden resistenten und sensiblen Stämmen von P. berghei wird Blut aus dem Schwanz in Hämatokrit-Röhrchen entnommen und für 5 Minuten zentrifugiert.
Nach der Infektion wird im 24-Stunden-Rhytmus Blut entnommen und wie oben behandelt.
Mit einem Diamantstift schneidet man das Hämatokrit-Röhrchen zwischen den gepackten Zellen und dem Serum auseinander. Das Serum wird dann mit T-2 verdünnt (1:1), in LiDS (1:50; Serum:LiDS) aufgenommen und wie unter SDS-PAGE (3.14.) beschrieben weiter bearbeitet. Densitometrische Auswertung der Elektrophoresegele wird mit dem ELSCRIPT 400, Hirschmann-Gerätebau, durchgeführt.

3.18.1. Chromatographische Analyse des Serums (CR und CS)

Bilirubin ist ein Abbauprodukt von Hämoglobin und läßt sich mit Chloroform und einem Pyridin:Chloroform-Gemisch (3:8) extrahieren.
Chloroform-Extraktion: Entsprechende Seren werden mehrmals mit Chloroform (1 ml Serum : 4 ml Chloroform) extrahiert.

Die Chloroformphasen werden vereinigt, anschließend in einem Rotationsverdampfer eingeengt und mit folgenden Laufmitteln chromatographiert.
Laufmittel 1: Benzol/Methanol/Eisessig (57:29:14)
Laufmittel 2: Äthylacetat/Isopropanol/25 % Ammoniak (20:4:1,5)

Pyridin-Chloroform-Extraktion: Serum wird mit Pyridin:Chloroform (3:8) mehrmals extrahiert und die gesammelten Extrakte im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird in Laufmittel 1 und Laufmittel 2 chromatographiert.

3.19. Analyse des Ratten-Harns

Der Rattenharn wird während der Parasitämie nach Infektionen mit Chloroquin-resistenten bzw. -sensiblen Stämmen unter Chloroquin-Gabe untersucht. Als Kontrolle dient Harn von gesunden Ratten mit und ohne Chloroquin.
Chromatographische Analyse des Harns wird in Laufmittel 1 / Laufmittel 2 erfolgen. Qualitative Auswertung wird bei 246 nm und 366 nm (UVIS DESAGA, Heidelberg) durchgeführt.

3.20. Untersuchung zum Chloroquin-Stoffwechsel in Chloroquin-sensiblen und -resistenten Plasmodium falciparum

3.20.1. Plasmodium Stämme: Plasmodium falciparum (T9-96)
Plasmodium falciparum (T9-102)

T9-96 und T9-102 sind clonierte Parasiten-Linien von einer P. falciparum Infektion aus Thailand. Die Klone haben wir freundlicherweise von Herrn Dr. D. Walliker (Institute of Animal Genetics, University of Edinburgh, Scotland) erhalten. Die mittlere Inhibitorkonzentration (MIC) für Chloroquin wurde für die Zell-Linie T9-109 mit 10^{-6} angegeben. Von Labor zu Labor sollen die MIC-Werte variieren (Walliker, persönliche Mitteilung).

3.20.2. Chloroquin-Behandlung

Die Parasiten werden für die Dauer von zwei Lebenszyklen ohne Zusatz von Chloroquin kultiviert (3.5.4.3.). Danach werden sie in Medien (RFMI-1640) mit verschiedenen Chloroquin-Konzentrationen (20-500 x 10^{-9}M) kultiviert. Die Bestimmung der Parasitenstämme erfolgt wie unter 3.4.1.

3.20.2. Chloroquinstoffwechsel (mit 14C-Chloroquin)

Die beiden Parasiten-Stämme (T9-96 und T9-102) werden bei einer Parasitämie von 10 % erst mit Sorbitol synchronisiert und kultiviert (3.6.1. und 3.5.3.). Nach 40 Stunden werden die Parasiten nochmals mit Gelatine (3.6.2.) synchronisiert. Mit den so gewonnenen Schizonten werden frische Erythrocyten so angeimpft, daß eine Parasitämie von 5 % erreicht wird. Die daraus resultierenden Ringstadien werden nochmals mit Sorbitol synchronisiert und dann in 14C-Chloroquin-haltigem Medium (30 µCi/µMol) weiterkultiviert. 24 Stunden von der Chloroquin-Zugabe an werden die Kulturen zentrifugiert und der Überstand sowie das Zellsediment wie folgt analysiert:

1) Erythrocyten:
Nach Absaugen des Überstandes wird das Erythrocytenpellet (PE/NE) mit fünf Tropfen Lysepuffer T4 lysiert. Das Lysat wird isoelektrisch fokussiert (pH 3-10 für 2 000 Vh), das Gel getrocknet und anschließend mit dem Linear-Analyser quantitativ ausgewertet.

2) Überstand (Kultur-Medium:
Der 2 200 g Überstand (Ü1) wird zunächst bei 100 000 g und 4° C für 30 Minuten in der Kontron-UZ (TGA-75) zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand (Ü2) im Verhältnis 1:4 mit heißem Methanol versetzt und die ausfallenden Proteine durch Zentrifugation bei 2200 g sedimentiert. Der Überstand (Ü3) wird abgenommen und der Niederschlag in 2 ml 80 % Methanol durch Zentrifugation bei 2200 g nachgewaschen. Der Überstand dieser Zentrifugation wird mit Ü3 vereinigt (Ü4).

1 ml vom Ü4 wird im Luftstrom eingeengt, der resultierende Rückstand in 5 µl dest. Wasser aufgenommen, in Laufmittel 2 (3.18.1.) chromatographiert und mit dem Linear-Analyser ausgewertet.

3.21. Untersuchung zur Reversion. Wiederherstellung der Chloroquin-Empfindlichkeit

Ratten werden mit dem chloroquin-resistenten Stamm Plasmodium berghei (NK65) infiziert und ohne Chloroquin-Behandlung, bis zur Pigment-Bildung, behandelt. Dies läßt sich an der Farbe der Leber erkennen (schwarze Farbe) und auch in Giemsa-gefärbten Ausstrichen (in reifen Schizonten).
Zwei Gruppen von Ratten werden nun mit dieser Linie infiziert (Abb. 8). Die eine Gruppe wird weiter ohne Chloroquin im Passage gehalten und wird als erste Chloroquin-Freie-Linie (CFL-1) bezeichnet. Die andere Gruppe wird gleich nach der Infektion mit der normalen Dosis (ND) von Chloroquin (85 mg Base/kg) behandelt und wird hier als Chloroquin-Linie (CL) bezeichnet.
Die CFL-1 wird weiter im Passage gehalten und die Ansprechbarkeit auf Chloroquin von Zeit zu Zeit geprüft.
Nach der fünften Passage von CL-1 wird von dieser Linie eine zweite Chloroquin-Freie-Linie (CFL-2) abgezweigt. Diese wird weiter unter chloroquinfreien Bedingungen in Passage gehalten (Abb. 8). Man prüft die Chloroquin-Sensibilität alle vier Wochen.

3.22. Untersuchung zur Beeinflussung der Parasitämie-Entwicklung und Pigmentbildung in Chloroquin-resistenten P. berghei (NK65) in Abhängigkeit von der Chloroquin-Dosis

Als Parasiten-Linie wird die CL-1 verwendet. Von dieser Passage zur anderen wird die Chloroquin-Dosis auf 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 und 1/100 der normalen Dosis (85 mg Base/kg) herabgesetzt.

Die Zell-Linie, die 1/100 der Normaldosis erhält, wird als H-Linie bezeichnet. Nach mehreren Passagen wird die Ansprechbarkeit dieser Zell-Linie auf die Normaldosis von Chloroquin überprüft. Als Kontrolle dient eine Gruppe von Versuchstieren, die weiterhin nur 1/100 der Normaldosis von Chloroquin erhält.

3.23. Bestimmung des Carbomonoxy-Hämoglobingehalts im Blut von mit Chloroquin-sensiblen und -resistenten P. berghei infizierten Ratten (Mod. nach Richterich 1968)

Bei dieser Methode wird der Anteil von Carbomonoxy-Hämoglobin als Prozent des Gesamt-Hämoglobins ermittelt. Zu diesem Zweck wird das Hämoglobin mit Ammoniak in Oxyhämoglobin überführt.
Aus den Quotienten 541 nm/561 nm und 577 nm/561 nm wird dann anhand eines Monogramms die Carbomonoxy-Hämoglobinkonzentration in Prozent ermittelt.

Reagenzien: Saponin-Lösung
1,5 g Saponin wird in 100 ml 0,1N Ammoniak gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung ist unbeschränkt haltbar.

Durchführung: 0,02 ml Kapillar-Blut werden zu 5,0 ml Saponinlösung in ein Zentrifugenglas gegeben, vorsichtig gemischt und kurz (2 Minuten) in der Hettich-Zentrifuge (Rotixa/K) bei 2 200 g und 4° C zentrifugiert.

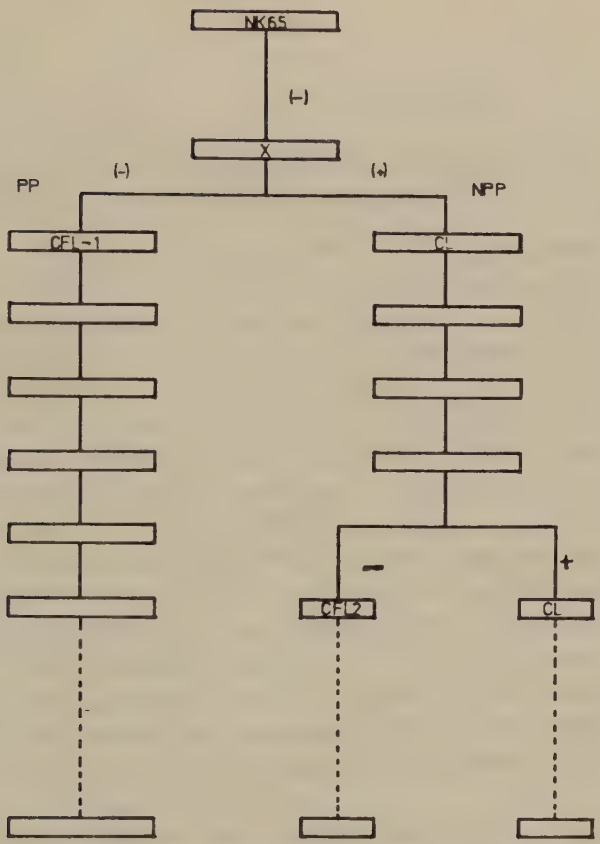


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Untersuchung der "Reversion" und Gewinnung der Chloroquin-Frei-Linie (CFL)

NK65: Infektion mit der Chloroquin-resistenten P.berghei

(-): Ohne Chloroquin-Behandlung

(X): Parasiten Population gleich nach der Reversion

(+): Chloroquin-Behandlung

PP: Pigmentproduzierende Parasiten

NPP: Nicht pigmentproduzierende Parasiten

CFL-1: Erste Chloroquin-Freie-Linie

CFL-2: Zweite Chloroquin-Freie-Linie

▭: Passagen

(---): Weitere Passagen

4. ERGEBNISSE

4.1. Verlauf der Parasitämie bei Chloroquin-resistenten und -sensiblen P. berghei in der Ratte

Chloroquin-sensible P. berghei (NK65) befallen reife als auch junge Erythrocyten (Reticulocyten). Auf der anderen Seite befällt der Chloroquin-resistente Stamm nur denjungen Erythrocyten (Abb. 9a und b). Eine Infektion mit Chloroquin-sensibler (CS) P. berghei führt, wenn unbehandelt, unweigerlich 4 bis 6 Tage nach der Infektion zum Tode (Abb. 9). Der Verlauf der Parasitämie mit dem Chloroquin-resistenten Stamm ist biphasisch. In den ersten 2 bis 3 Tagen nach der Infektion steigt die Parasitämie an, die zwischen dem 4. und 7. Tag abnimmt. Danach nimmt die Parasitämie zu und erreicht den höchsten Wert um den 10. Tag (post infektionem). Bis zum 21. Tag heilen die Tiere ohne Therapie ab (Spontanheilung). Die Infektion mit Chloroquin-resistenten als auch -sensiblen P. berghei in der Ratte hängt vom Alter der Ratte ab . Ab einem Körpergewicht der Versuchstiere von 80 g geht die P. berghei Infektion nicht mehr an (Abb. 9).

4.2. Chloroquin-Behandlung der Chloroquin-sensiblen P.berghei-Infektion in der Ratte

Chloroquin-Behandlung (85mg Base/Tag/ kg Körpergewicht) einer mit CS P. berghei infizierten Ratte führte zur Senkung der Parasitämie (bei 75 %) innerhalb der ersten 24 Stunden trotz einem Anstieg in den ersten 6 Stunden.
Weitere Behandlung (nach je 24 Stunden) führte zur totalen Vernichtung der Parasiten ohne Wiederaufbruch der Infektion (Abb. 10a). Es waren sowohl die in Reticulocyten als auch in reifen Erythrocyten befindlichen Parasiten durch Chloroquin hemmbar (Abb. 10b).

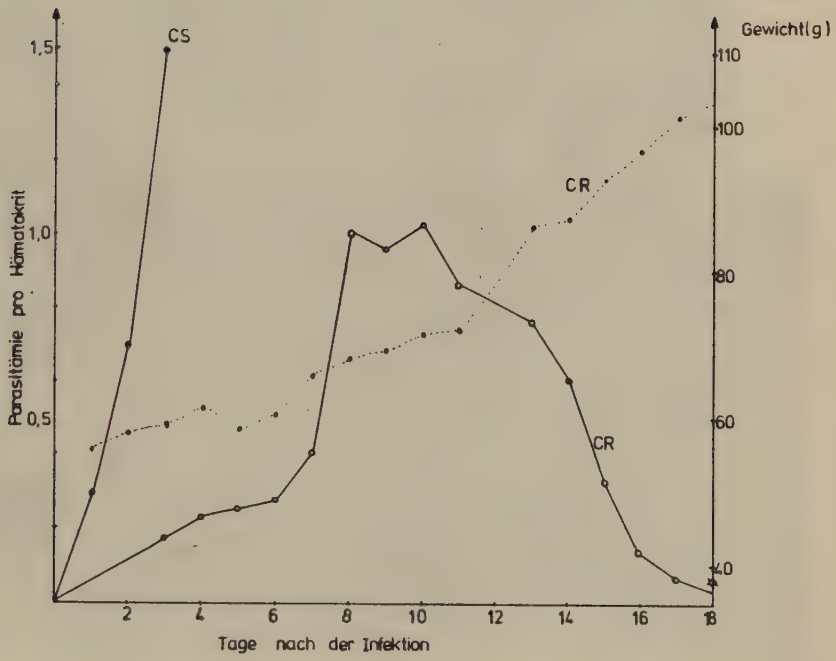


Abbildung 9: Verlauf der Parasitämie bei Chloroquin-resistenter (CR) und Chloroquin-sensibler (CS) P.berghei Infektion in den Ratten.

..... Gewichtszunahme im Verlaufe der Parasitämie in CR-infizierten Ratten.

Während die mit dem Chloroquinsensiblen Erreger infizierten Tiere in der Regel zwischem dem 3. und 5. Tag postinfectionem sterben, steigt die Parasitämie bei der mit dem entsprechenden resistenten Stamm infizierten Versuchstieren bis zum 10. Tag an und heilt dann spontan ab (Abb. 9).

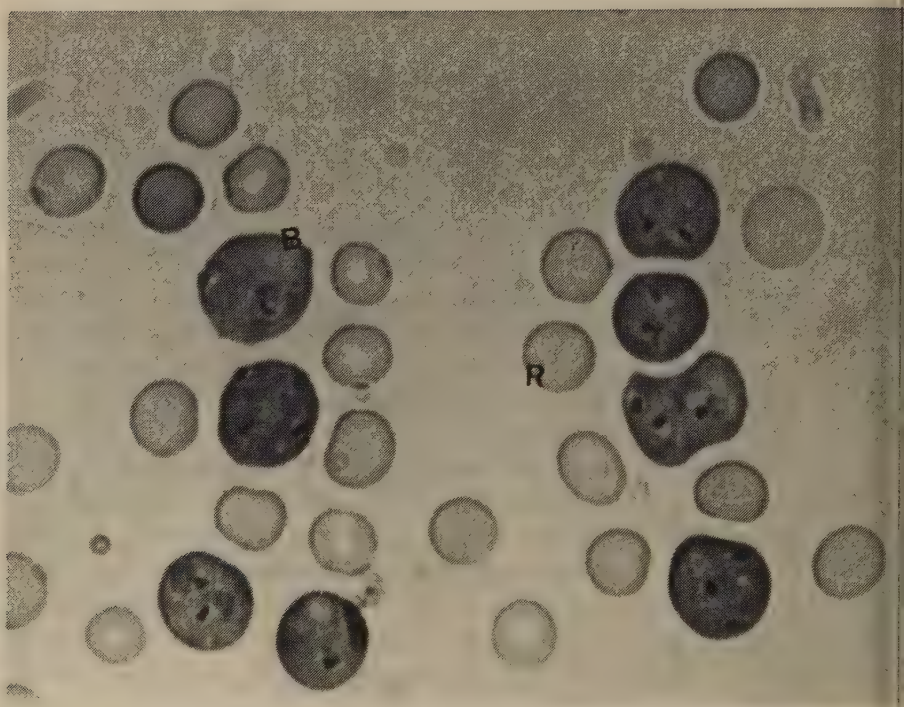


Abbildung 9a: Giemsa-gefärbter Blutausstrich von Chloroquin-resistentem (CR) P.berghei der Ratte.
Infizierbare Erythrocyten (junge Erythrocyten): Blaugefärbt (B).
Nicht-infizierbare Erythrocyten (reife Erythrocyten): Rosagefärbt (R).

Während das Chloroquinresistente P.berghei bevorzugt in jungen Erythrocyten bzw. in Reticulocyten gefunden wird (Abb. 9a) befällt der entsprechende sensible Stamm sowohl junge als auch reife bzw. alte Erythrocyten (Abb. 9b).

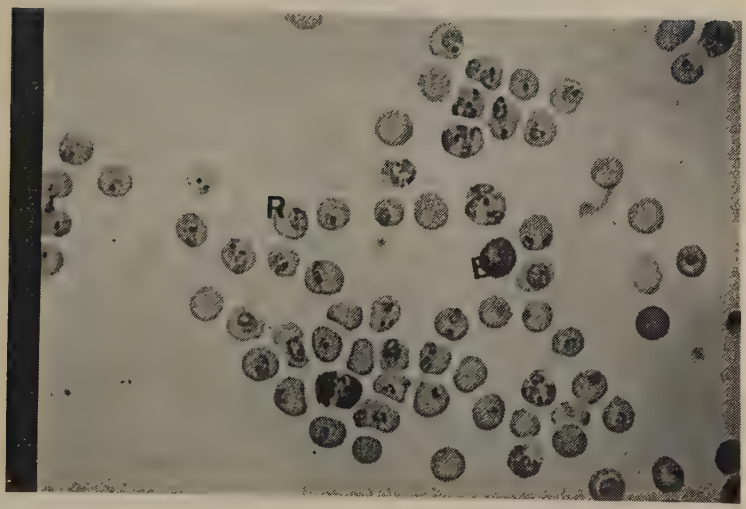


Abbildung 9b: Giemsagefärbter Blutausstrich von Chloroquin-sensiblen (CS) P. berghei der Ratte.
CS P. berghei befällt sowohl reife als auch junge Erythrocyten.

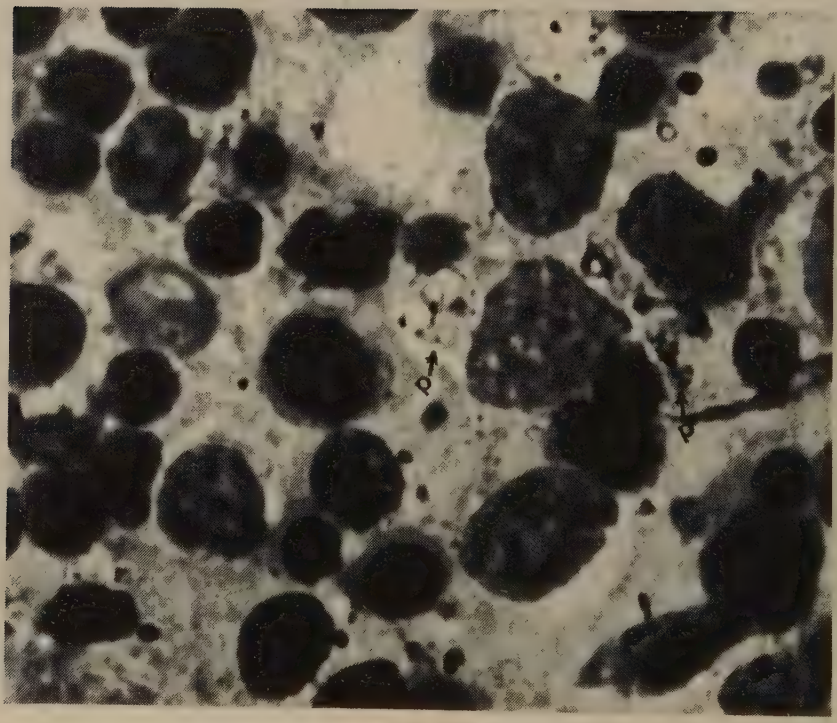


Abbildung 9c: Giemsagefärbtes Quetschpräparat von der Milz einer mit Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierten Ratte.
Pigmentablagerung (Braun) deutlich sichtbar (P).

Die Milz und die Leber der Versuchstiere, die mit dem Chloroquin-sensiblen P.berghei infiziert wurden, waren vergrößert, schwarz-braun verfärbt und enthielten mikroskopisch sichtbar das Malariapigment "P" (Abb. 9c und 9e). Leber und Milz der Versuchstiere, die mit dem entsprechenden Chloroquin-resistenten Stamm infiziert wurden, waren ebenfalls vergrößert, jedoch nicht schwarzbraun verfärbt und enthielten kein mikroskopisch sichtbares Pigment (Abb. 9d).

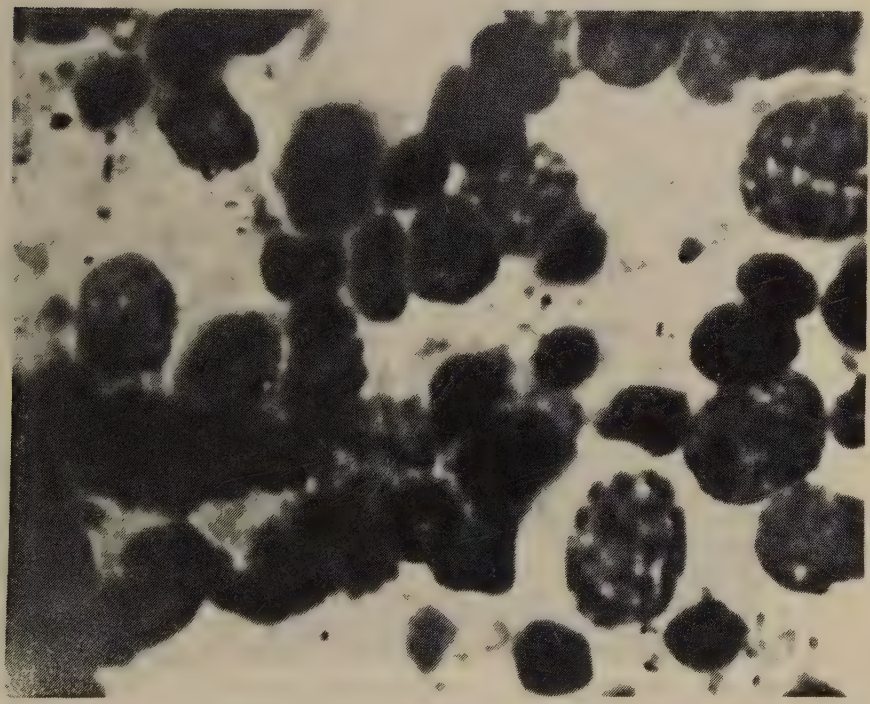
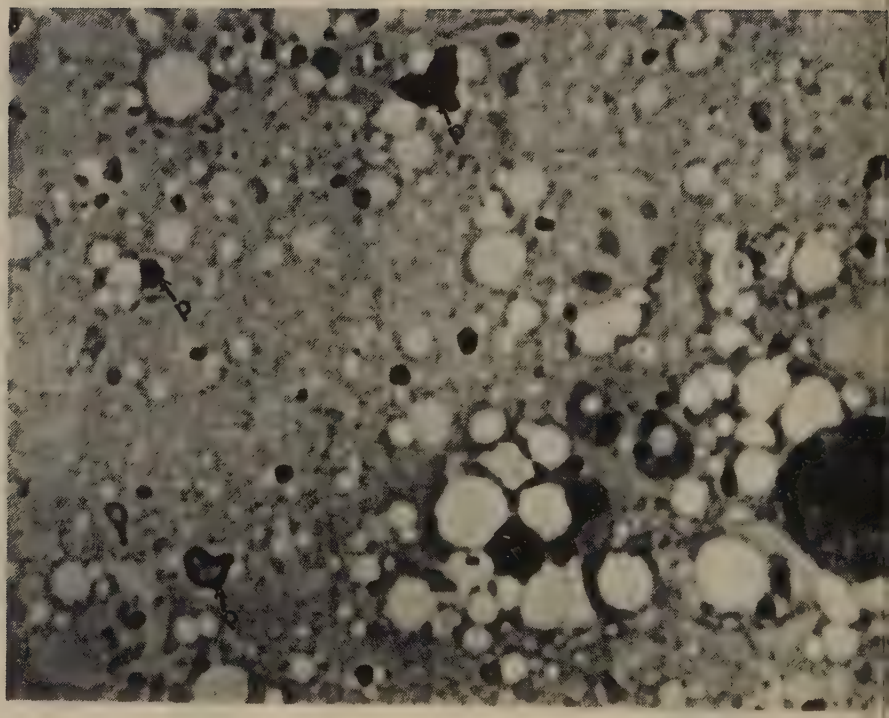


Abbildung 9d: Giemsagefärbtes Quetschpräparat von der Milz einer mit Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei infizierten Ratte. Es ist keine Pigmentablagerung sichtbar.



Abbbildung 9e: Giemsagefärbtes Quetschpräparat von Leber einer mit Chloroquin-sensiblen (CS) P. berghei infizierten Ratte.
Braune Ablagerungen deuten auf Malaria-Pigment hin (P).

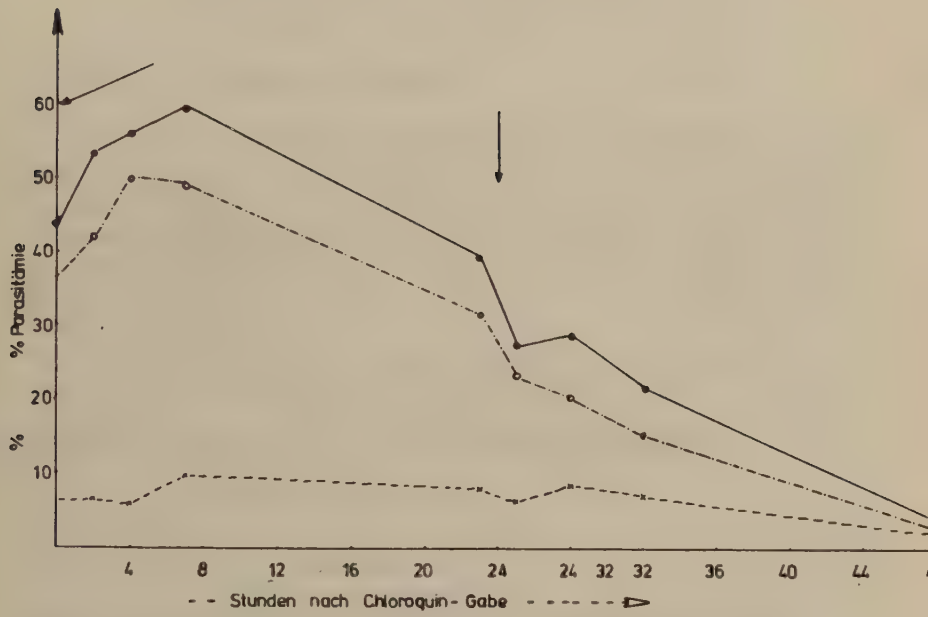


Abbildung 10a: Chloroquinwirkung auf eine Chloroquin-sensible (CS) P. berghei Infektion

● —— ●	Gesamtparasitämie
o----o	Prozent parasitierte reife Erythrocyten
x----x	Prozent parasitierte junge Erythrocyten (Reticulocyten)
⟶	Chloroquin-Gabe

Das Chloroquin-sensible P.berghei infiziert sowohl alte als auch junge Eryhtrocyten (Abb.10a), wobei im Anfang der Parasitämie überproportional häufig Reticulocyten befallen werden (Abb. 10b). Von einer Chloroquin-Behandlung sind jedoch im Anfang überwiegend die Parasiten betroffen, die im reifen Erythrocyten sind (Abb.10a). Gegen Ende der Behandlung verschwinden jedoch auch die Parasiten, die sich in den jungen Erythrocyten befinden, obwohl die Zahl der Reticulocyten zunimmt (Abb. 10b).

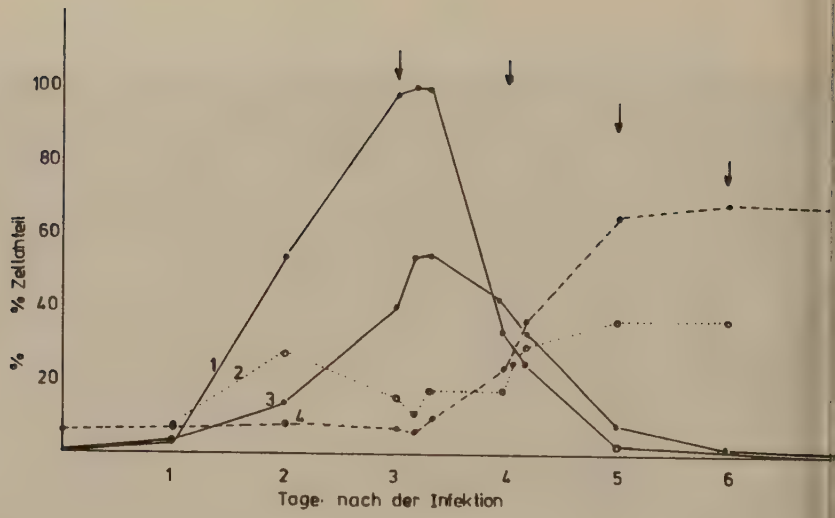


Abbildung 10b: Allgemeine Änderung des Befalls von jungen und alten Erythrocyten durch eine Chloroquin-sensible P.berghei unter einer Chloroquin-Therapie.
Pfeile deuten auf Chloroquin-Gabe hin.

(1) Ablauf der Parasitämie in Reticulocyten.

$$\frac{\text{Parasitierte Reticulocyten}}{\text{Gesamt Reticulocyten}} \times 100$$

(2) Verhältnis der Parasitämie in Reticulocyten zu Gesamtparasitämie.

(3) Ablauf der Parasitämie in reifen Erythrocyten.

$$\frac{\text{Parasitierte reife Erythrocyten}}{\text{Gesamt reife Erythrocyten}} \times 100$$

(4) Verhältnis von Reticulocyten zu reifen Erythrocyten im Ablaufe der Parasitämie und Chloroquin-Behandlung.

4.3. Hämoglobinabbau in Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten Plasmodium berghei

4.3.1. Bestimmung als Hämatin

Die Hämatinbestimmung durch alkalische Extraktion (3.16.1.) im Ablaufe der Parasitämie zeigte, daß die mit dem Chloroquin-resistenten Stamm infizierten Erythrocyten bei einer gegebenen Parasitämie weniger Hämatin enthalten als die mit dem Chloroquin-sensiblen Stamm infizierten Erythrocyten (Abb. 11).

4.3.2. Bestimmung als Änderung in Eisen-59-Gehalt

4.3.2.1. In vivo Markierung der Ratten-Erythrocyten mit Eisen-59

Das Einspritzen von dem radioaktiven Eisen führte innerhalb von 30 Minuten zum Einbau in die verschiedenen Isoproteine des Ratten-Hämoglobins (Abb. 12). Wie aus Abbildung 13 zu entnehmen ist, scheint dieser Einbau unterschiedlich in den verschiedenen Isoproteinen abzulaufen.

4.3.2.2. Änderung des Eisen-Gehalts während der Blutschizogonie

Die mit dem Chloroquin-resistenten Stamm infizierten Erythrocyten (CR-PE) zeigen eine deutliche Abnahme des Eisen-Gehalts im Ablaufe der Blut-Schizogonie bis zu etwa 15 % des anfänglichen Werts. Auf der anderen Seite zeigen mit dem Chloroquin-sensiblen Stamm infizierte Erythrocyten (CS-PE) einen deutlich höheren Eisen-Gehalt im Vergleich zu den CR-PE (Abb. 18 und 19). Autoradiographische Analyse der IEF-Gele ergab drei Komponenten (Abb. 14a, b und 15 a, b)

a) Isoproteine von Hämoglobin (Hbs)
b) Das Malaria-Pigment (P)
c) Eine negativ geladene und eisenhaltige Komponente, die hier als Komponente X gekennzeichnet ist.

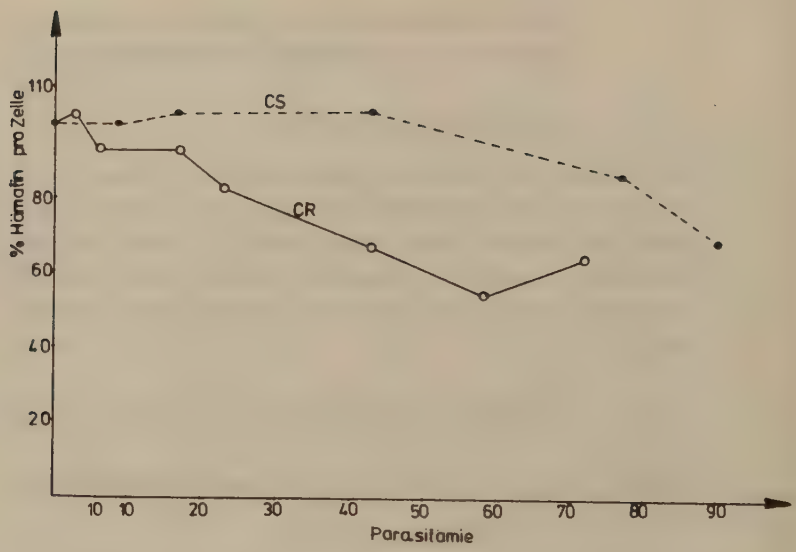


Abbildung 11: Änderung der Gesamt-Hämatinkonzentration im Ablaufe der Parasitämie in der Ratte.

●---● Mit Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierte Ratte.

o——o Mit Chloroquin-resistenten (CR) P.berghei infizierte Ratte.

Das Gesamt-Hämatin pro Erythrocyt ändert sich im Ablaufe der Blutschizogonie des Chloroquin-sensiblen P.berghei bis zu einer Parasitämie von 50 % nicht, während es im Eryhtrocyten, der mit einem entsprechenden resistenten Stamm infiziert ist, deutlich abnimmt (Abb.11). Das bedeutet, daß der resistente Stamm Hämatin und wahrscheinlich auch das Eisen aus der Zelle entfernt, während der sensible Stamm es in der Zelle ablagert (Abb. 11 und 18,19).

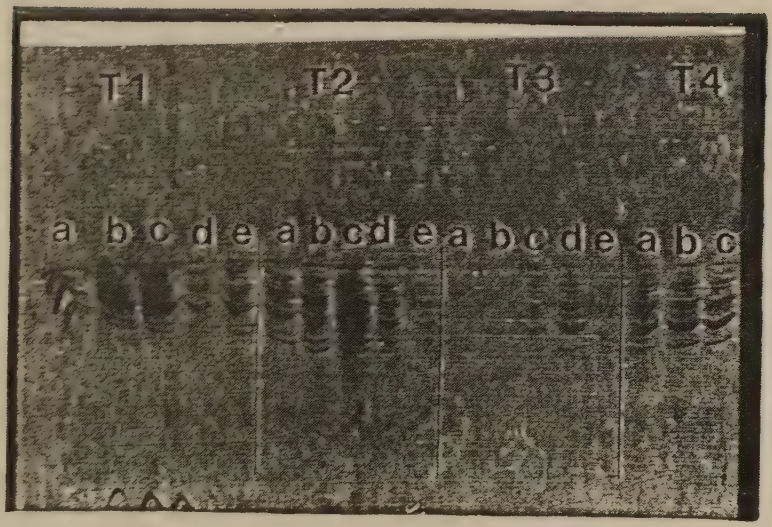


Abbildung 12: Kinetik der ^{59}Fe-Markierung von Rattenerythrozyten:
Autoradiographie von in-vivo-markierten Rattenerythrocytenproben auf der Isoelektrischen Fokussierung.

a) Probe 30 min. nach der ^{59}Fe-Gabe
b) Probe 60 min. nach der ^{59}Fe-Gabe
c) Probe 90 min. nach der ^{59}Fe-Gabe
d) Probe 150 min.nach der ^{59}Fe-Gabe
e) Probe 210 min.nach der ^{59}Fe-Gabe

T_1 - T_4 : Ratte 1 - Ratte 4

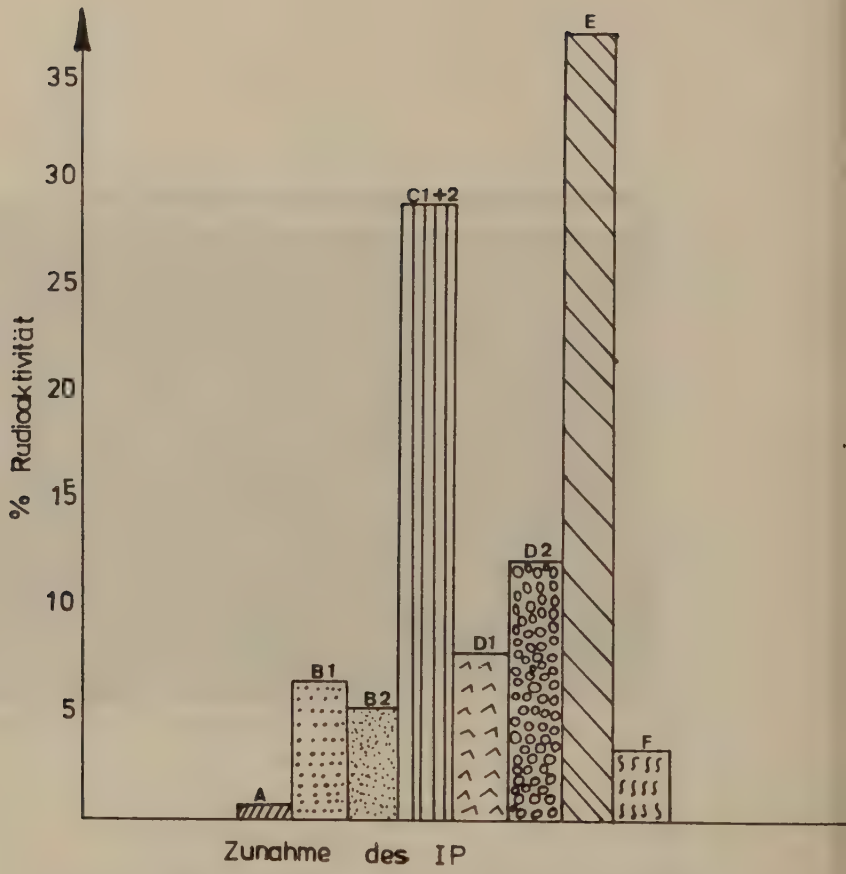


Abbildung 13: Verteilung der Radioaktivität (^{59}Fe) in den einzelnen Hämoglobinbanden (Isoproteine)

Ratten besitzen zwischen 10 und 13 verschiedene Hämoglobine (Abb.12). Radioaktiv markiertes Eisen wird außerordentlich schn in die Rattenhämoglobine eingebaut (Abb. 12). Der Anteil des eingebauten radioaktiven Eisens in die verschiedenen Isoproteine des Hämoglobins ist ungleich (Abb. 13).

In Chloroquin-sensiblen (CS) und resistenten (CR) P.berghei wird Hämoglobin im Ablaufe der intrazellularen Parasitenvermehrung gleichermaßen abgebaut (Abb. 14a/b sowie Abb. 16 für CS und Abb. 15a/b sowie Abb. 17 für CR).

Das Schicksal der durch den Hämoglobinabbau freigesetzten Radioaktivität ist für den resistenten und sensiblen Stamm unterschiedlich. Im sensiblen Stamm bleibt die durch den Hämoglobinabbau freigesetzte Radioaktivität, das sind am Ende der Blutschizogonie etwa 70 % der Gesamtradioaktivität des Hämoglobin, an der Auftragstelle als Pigment liegen (Abb. 14a/b, 16, 20).
Beim Chloroquin-resistenten Stamm wird an der Auftragstelle nur wenig der aus dem Hämoglobinabbau zu erwartenden Radioaktivität gefunden - etwa 5 % - an der Auftragstelle wiedergefunden (Abb. 15a/b, 17, 20). Ein kleiner Anteil der Radioaktivität - ca. 15 % (Abb. 21) - wird bei dem resistenten Stamm als Bande X im mehr sauren Bereich der Fokussierungsgele gefunden (Abb. 15b). Bei dem sensiblen Stamm dagegen befindet sich an dieser Stelle praktisch nichts (Abb. 14b, 21). Der überwiegende Anteil der aus dem Hämoglobinabbau freigesetzten Radioaktivität verschwindet bei dem resistenten Stamm aus der Zelle.

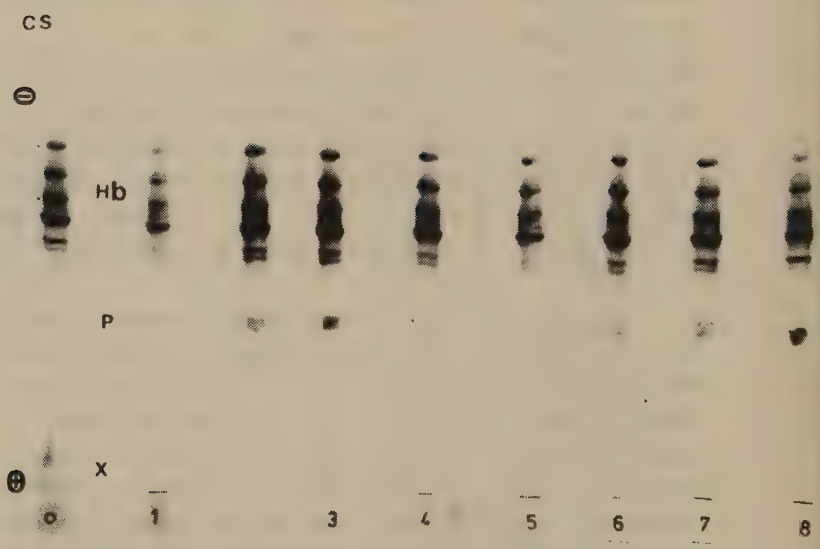


Abbildung 14a: Autoradiographie eines IEF-Gels von ^{59}Fe-markierten und mit Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierten Rattenerythrocyten, die über einen diskontinuierlichen Percoll-gradienten nach den verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt wurden. Steigende Fraktionsnummer = Zunahme der Blutschizogonie.

Hb: Isoproteine des Rattenhämoglobins

P: Auf der Auftragsstelle liegen gebliebene Radioaktivität (Das Malaria-Pigment)

X: Eisenhaltige und negativ geladene Komponenten

(-): Kathode

(+): Anode

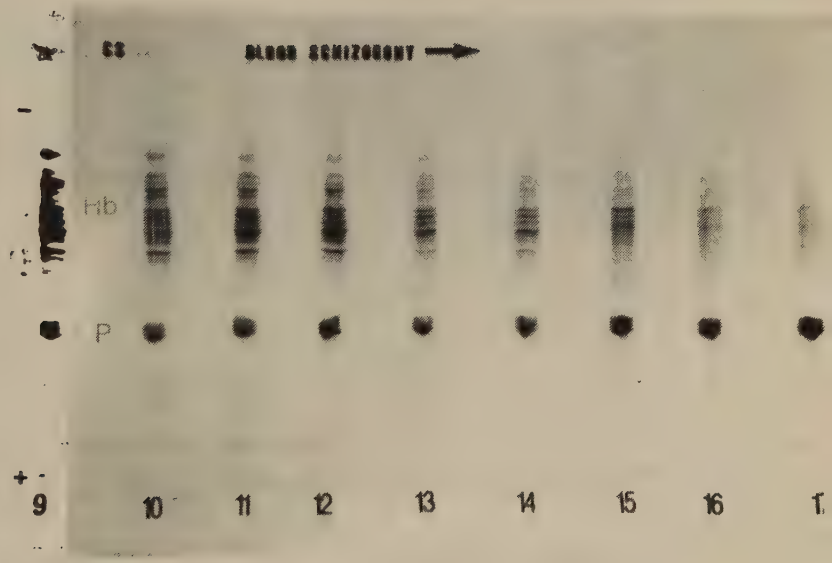
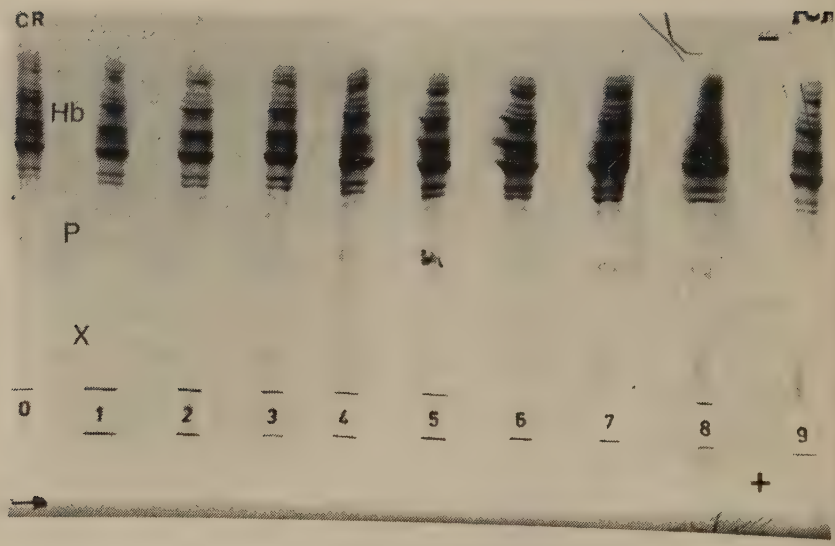


Abbildung 14b: Autoradiographie eines IEF-Gels von ^{59}Fe-markierten und mit Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierten Rattenerythrocyten, die über einen diskontinuierlichen Percoll-gradienten nach den verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt wurden. Steigende Fraktionsnummer = Zunahme der Blutschizogonie.

Hb:	Isoproteine des Rattenhämoglobins
P:	Auf der Auftragsstelle liegen gebliebene Radioaktivität (Das Malaria-Pigment)
X:	Eisenhaltige und negativ geladene Komponenten
(-):	Kathode
(+):	Anode



-- FRAKTION NR ------>

Abbildung 15a: Autoradiographie eines IEF-Gels von ^{59}Fe-markierten und mit Chloroquin-resistenten (CR) P.berghei infizierten Rattenerythrocyten, die über einen diskontinuierlichen Percoll-gradienten nach den verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt wurden. Steigende Fraktionsnummer = Zunahme der Blutschizogonie.

Hb: Isoproteine des Rattenhämoglobins

P: Auf der Auftragsstelle liegen gebliebene Radioaktivität (Das Malaria-Pigment)

X: Eisenhaltige und negativ geladene Komponenten

(-): Kathode

(+) Anode

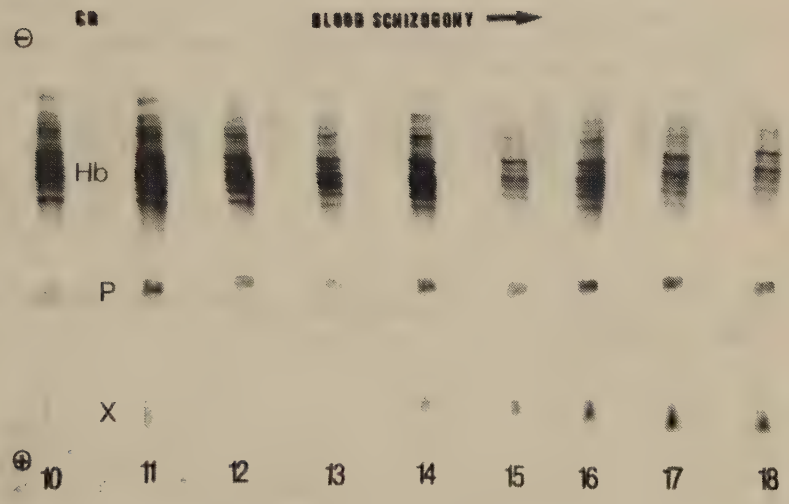


Abbildung 15b: Autoradiographie eines IEF-Gels von ^{59}Fe-markierten und mit Chloroquin-resistenten (CR) P.berghei infizierten Rattenerythrocyten, die über einen diskontinuierlichen Percollgradienten nach den verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt wurden. Steigende Fraktionsnummer = Zunahme der Blutschizogonie.

Hb:	Isoproteine des Rattenhämoglobins
P:	Auf der Auftragsstelle liegen gebliebene Radioaktivität(Das Malaria-Pigment)
X:	Eisenhaltige und negativ geladene Komponenten
(-):	Kathode
(+):	Anode

Abbildung 16: Abbau der Hämoglobin-Isoproteine (Ratte) während der Blutschizogonie der Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei.
Die infizierten Zellen wurden über einen diskontinuierlichen Percollgradienten in die verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt und die Proteine in einer IEF aufgetrennt. Die nativ getrockneten Gele wurden mit einem rot sensiblen "Kopiergerät" (Kodak Ektaprint 165) kopiert.

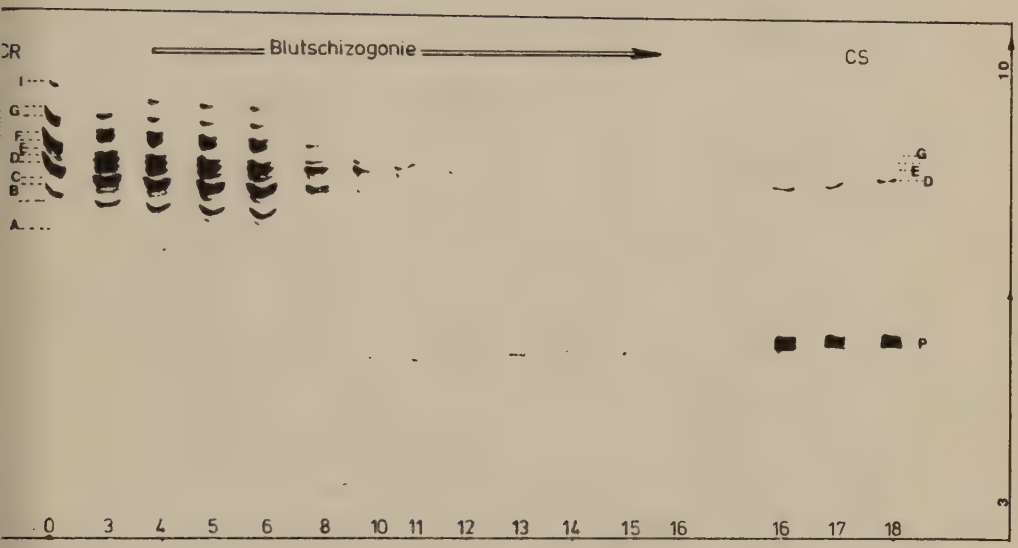


Abbildung 17: Abbau der Hämoglobin-Isoproteine (Ratte) während der Blutschizogonie der Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei.
Die infizierten Zellen wurden über einen diskontinuierlichen Percollgradienten in die verschiedenen Stadien der Blutschizogonie aufgetrennt. Die nativ getrockneten Gele wurden mit einem rot sensiblen "Kopiergerät" (Kodak Ektaprint 165) kopiert.

CS 16, 17 und 18 sind Vergleichsproben von Chloroquin-sensiblen P. berghei.

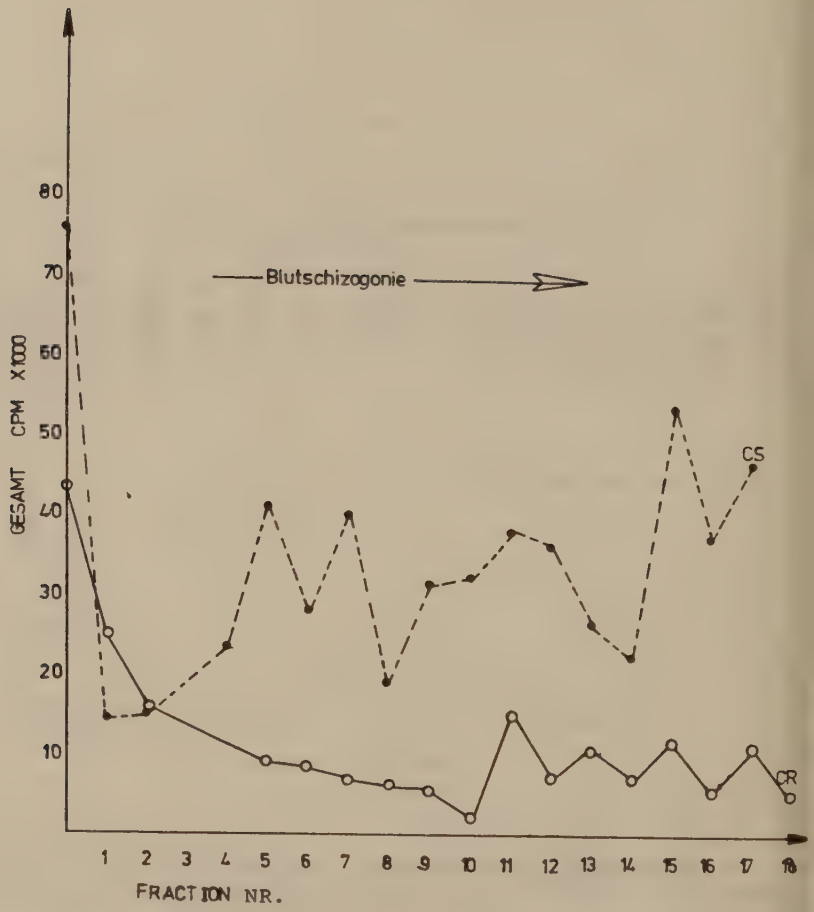


Abbildung 18: Verteilung der Radioaktivität (^{59}Fe) in den einzelnen Fraktionen der Percollgradienten.
CS: Chloroquin-sensible P. berghei
CR: Chloroquin-resistente P. berghei
Steigende Fraktionnummer = Zunahme der Blutschizogonie

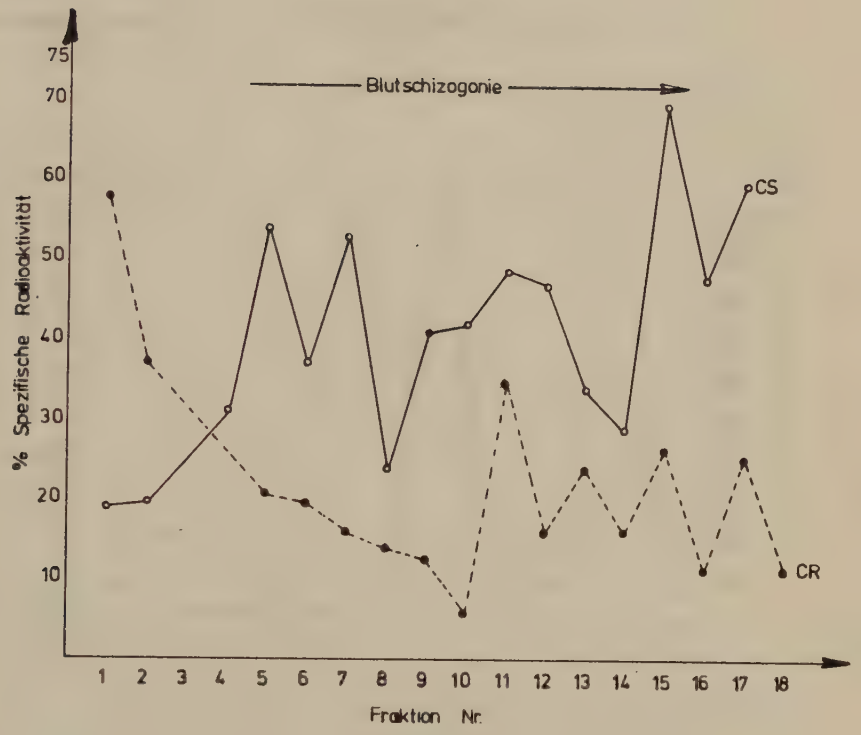


Abbildung 19: Spezifische Radioaktivität von ^{59}Fe-markierten Rattenerythrozyten im Ablaufe der Blutschizogonie (Percollgradient)

CR: Chloroquin-resistente P. berghei
CS: Chloroquin-sensible P. berghei

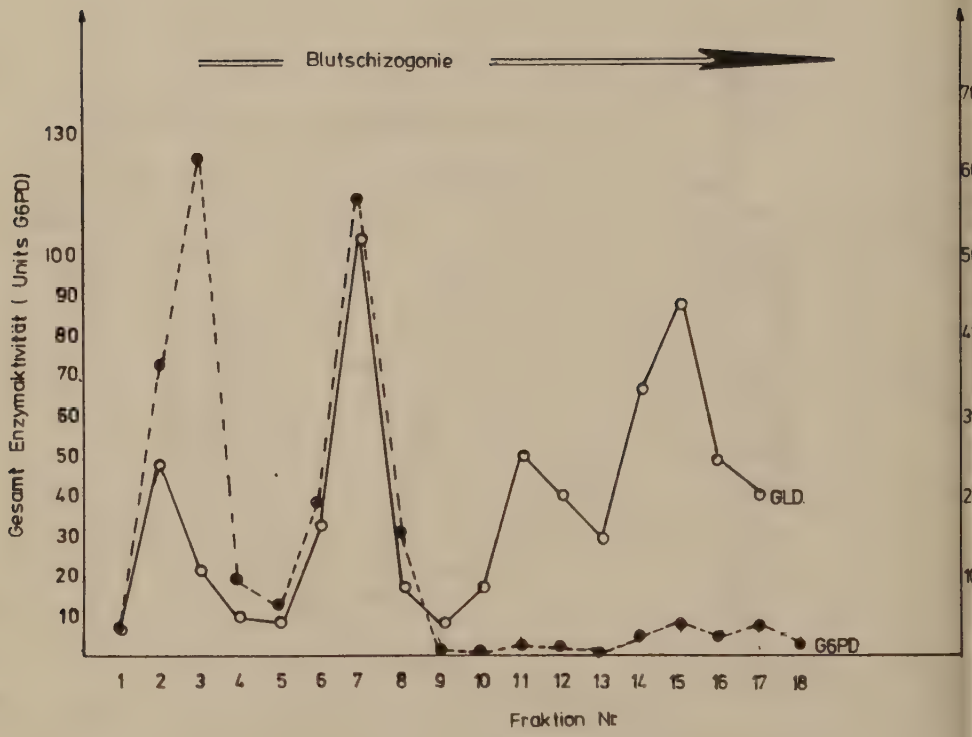


Abbildung 19a: Verteilung der parasitären (GLD) und erythrocytären (G6PD) Leitenzyme während der Blutschizogonie (Percollgradienten) der Chloroquin-resistenten P.berghei in der Ratte.

G6PD: Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GLD: Glutamat Dehydrogenase ($NADP^+$abhängige)

Sowohl das Chloroquin-resistente als auch -sensible P.berghei besitzt eine Glutamatdehydrogenase (Abb. 19a,b), wobei die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die im Parasiten nur in unbedeutenden Aktivitäten vorkommt, als Leitenzym für das Wirtszellstroma angesehen werden kann und am Ende der Parasitenvermehrung aus dem Erythrocyten praktisch verschwunden ist (Abb. 19a und 19b).

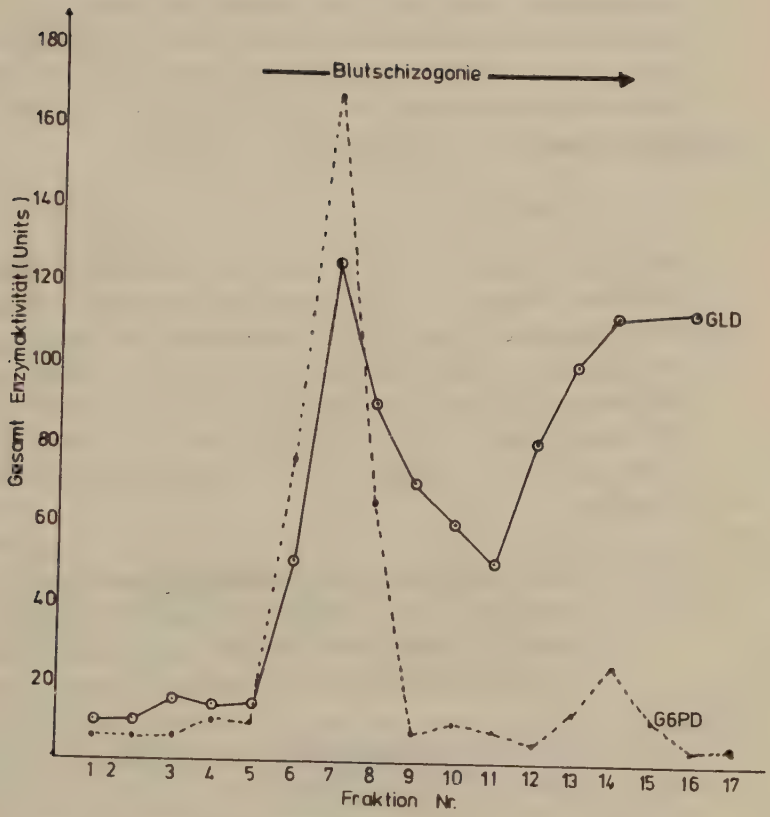


Abbildung 19b: Verteilung der parasitären (GLD) und erythrozytären (G6PD) Leitenzyme während der Blutschizogonie (Percollgradienten) der Chloroquin-sensiblen P. berghei in der Ratte.

G6PD Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase

GLD: Glutamat Dehydrogenase ($NADP^+$-abhängige)

In den CS-PE wurden 65 % des abgebauten Hämoglobins als Malaria-Pigment (Haemozoin) in den Parasiten abgelagert. Im Gegensatz dazu wurde in den CR-PE nur noch 5 - 10 % des abgebauten Hämoglobins an der Auftragsstelle gefunden (Abb. 15 und 20).

4.3.4. Bande X

Obwohl die Bande X in NE, CR-PE und CS-PE zu finden war, wurde sie während der Mittel- und End-Phase der Blutschizogonie vermehrt in den CR-PE produziert. Sie stieg von 2 % (des gesamten Eisens) am Anfang auf 15 % am Ende der Blutschizogonie. In den CS-PE gab es keine signifikante Änderung des Gehalts von Bande X (Abbildung 21). Bande X ist negativ geladen, eisenhaltig und zeigt negative Catalase-Aktivität.

4.4. SDS-Page-Analyse der Eisen-59-Proben von Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten Plasmodium berghei infizierten Ratten-Erythrocyten nach der Dichtegradienten-Zentrifugation (Percoll-Gradient)

4.4.1. Fraktionen von Chloroquin-sensiblen P. berghei infizierten Erythrocyten

Die Analyse der einzelnen Fraktionen nach dem Percoll-Gradienten (SDS-PAGE 3.14., Autoradiographie 3.15.) deuteten auf drei eisen-haltige Komponenten hin, die als A, B und C mit abnehmendem Molekulargewicht bezeichnet wurden (Abb.22).

Komponente A hat ein sehr hohes Molekulargewicht (über 97 KD) und nahm im Ablaufe der Blutschizogonie ab.
Komponente B hat ein Molekulargewicht von etwa 16 KD und ist auch in nicht infizierten Erythrocyten zu finden. Sie nimmt mit der Blutschizogonie zu.
Komponente C ist eine niedermolekulare Substanz (unter 14 KD) und zeigte keine Beziehung zur Blutschizogonie.

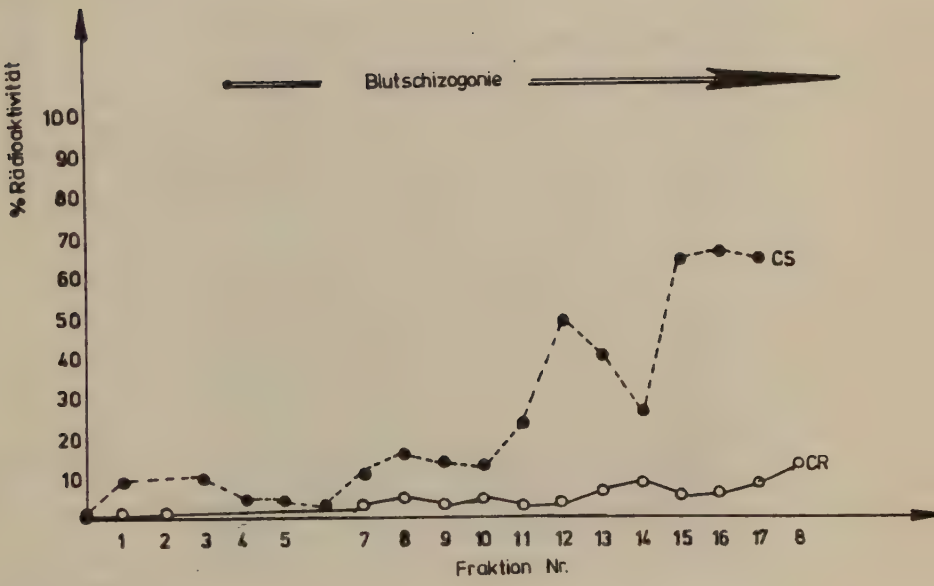


Abbildung 20: "Pigmentbildung" im Ablaufe der Blutschizogonie (Percollgradienten).

% Radioaktivität: Radioaktivität auf der Auftragsstelle / Gesamt Radioaktivität x 100

(●----●): Chloroquin-sensible P. berghei

(o——o : Chloroquin-resistente P.berghei

In Abb. 20 ist die Radioaktivität, die beim Chloroquin-resistenten und dem entsprechenden sensiblen P.berghei an der Auftragstelle von Fokussierungsgelen liegen bleibt.

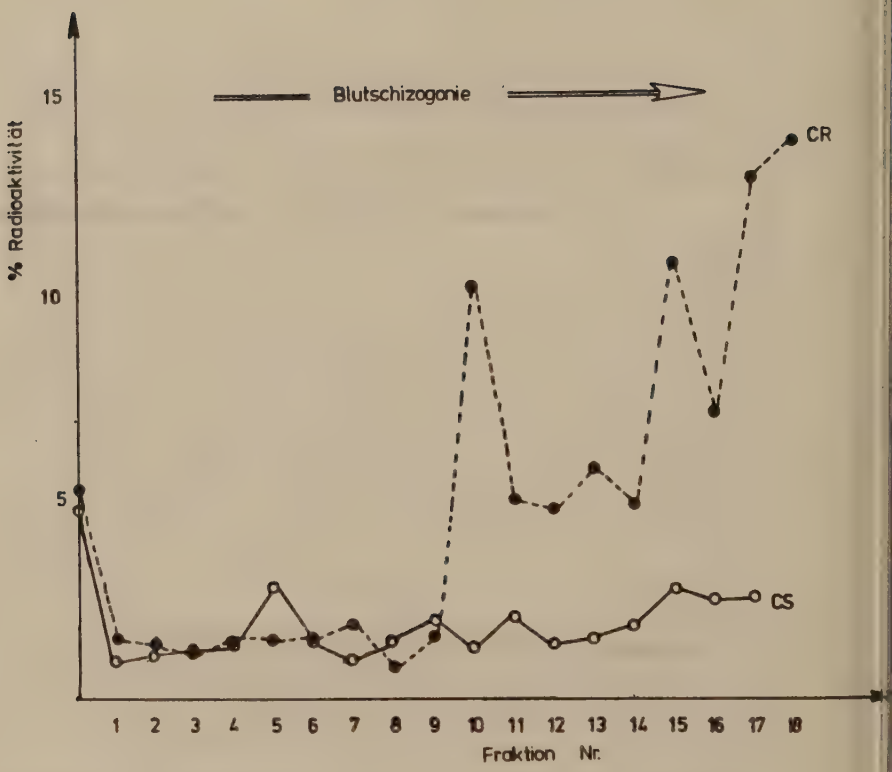


Abbildung 21: Prozent Radioaktivität (^{59}Fe) der unbekannten und negativ geladenen Bande "X" im Ablaufe der Blutschizogonie

% Radioaktivität = CPM in Bande "X" pro

$$\frac{\text{Erythrocyt}}{\text{Gesamt CPM pro Erythrocyt}} \times 100$$

(o——o)CS: Chloroquin-sensible P.berghei

(●---●)CR: Chloroquin-resistente P.berghei

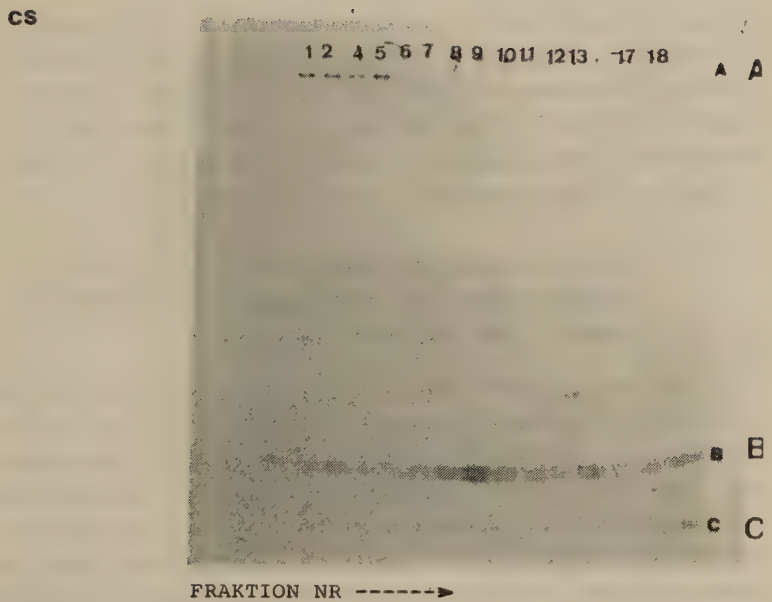


Abbildung 22: Autoradiogram von SDS-PAGE der ^{59}Fe-markierten (in vivo) und mit Chloroquin-sensiblen (CS) P. berghei infizierten Rattenerythrocyten nach dem Percollgradienten.
Expositionszeit: 13 Tage

Steigende Fraktion-Nummer = Zunahme der Blutschizogonie

1 u. 2: Proben von nicht parasitierten Erythrocyten.
4 - 18: Fraktion Nummer, steigende Blutschizogonie.

Die Autoradiographie zeigt 3 eisenhaltige Komponenten A, B und C (Abb. 22). Auch im entsprechenden resistenten Stamm werden diese drei mit ^{59}Fe-markierten Banden gefunden (Abb. 23).

4.4.2. Fraktionen von Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten Erythrocyten

Es wurden auch die drei Komponenten (A, B und C) wie bei CS beschrieben, beobachtet. Allerdings zeigte sich Komponente A praktisch unverändert innerhalb der Fraktionen 3 bis 11 aber ein Anstieg in der Fraktion 13 und 14 (Abb. 23). Komponente B war vermehrt in Fraktionen 6 bis 8 (in der Mitte der Blutschizogonie) zu sehen.

4.5. Schicksal der Häm-Gruppen während der intraerythrocytären Vermehrung bei Chloroquin-resistenten (CR) Plasmodium berghei

Die quantitative Bestimmung des Porphyringehaltes pro Zelle während der Blutschizogonie von CR P. berghei nach einer alkalischen Extraktion (3.16.1.) der gesamten Isoproteine von Hämoglobin der Fokussierungsgele (3.13.) zeigte folgendes: Im Ablauf der Blutschizogonie nimmt der Hämoglobingehalt pro Zelle bis auf etwa 20 % ab (Abb. 24), ohne daß meßbare Mengen an Malaria-Pigment an der Auftragstelle gefunden wurden.
Spektroskopische Untersuchungen representativer Fraktionen mit gleicher Zellzahl zeigen eine deutliche Abnahme der Soret-Bande bei 400 nm (Abb. 25); ein weiterer Beweis dafür, daß die Häm-Gruppen im Ablauf der Blutschizogonie aus den Zellen verschwinden müßten.
Gleichzeitig nimmt die Absorptionsbande bei 595 nm in Korrelation zur Blutschizogonie ab (Abb. 25).

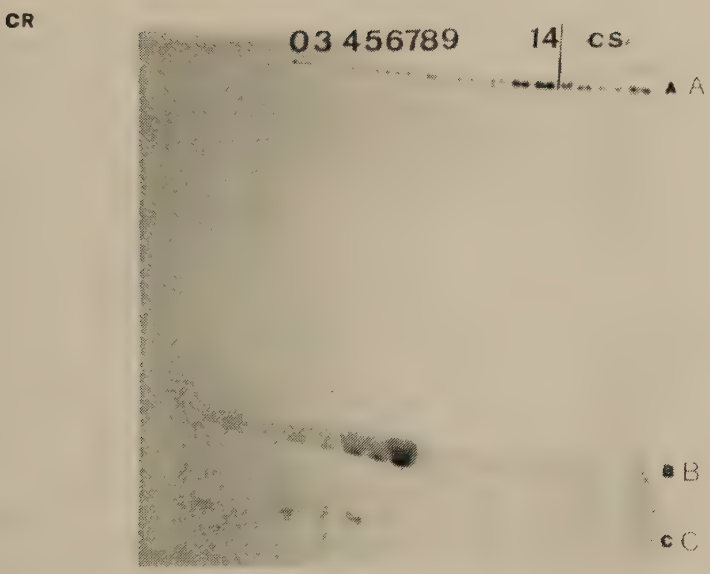


Abbildung 23: Autoradiogram von SDS-PAGE der ^{59}Fe-markierten (in vivo) und mit Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei infizierten Rattenerythrocyten nach dem Percollgradienten.
Expositionszeit: 13 Tage.
Drei Komponenten (A,B,C) feststellbar.

Steigende Fraktion-Nummer = Zunahme der Blutschizogonie.

O : Nicht infizierten Rattenerythrocyten

3-14: Zunahme der Blutschizogonie.

CS: Vergleich von Proben von mit CS infizierten Erythrocyten. Von links nach rechts Raktion 18, 14 u. 13.

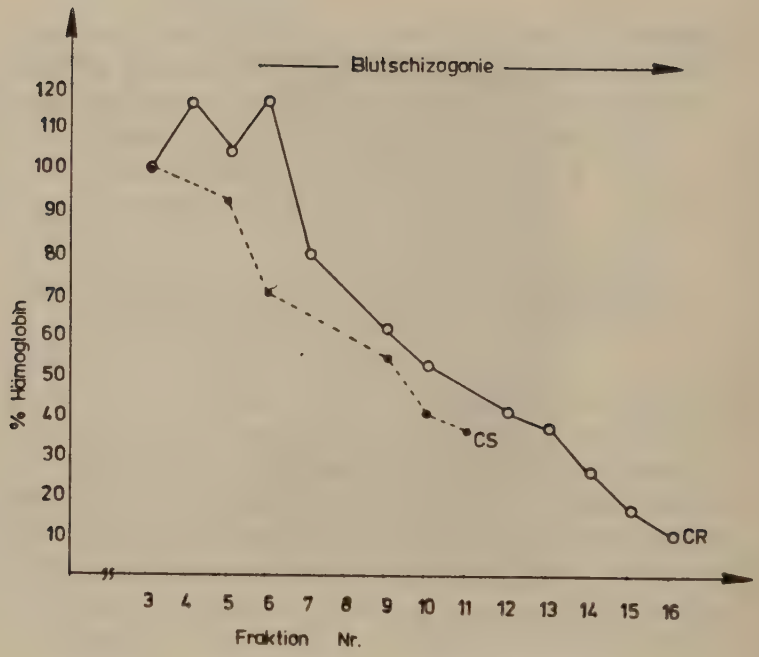


Abbildung 24: Abbau des Rattenhämoglobins während der Blutschizogonie (Percollgradienten) der Chloroquin-sensiblen (CS) und Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei.
Bestimmung als Hämatin. Die Hämoglobin-Banden wurden ausgeschnitten, das Porphyrin mit 0,1N NaOH in 80 % Ethanol extrahiert, zentrifugiert und im Photometer bei 400 nm gemessen.

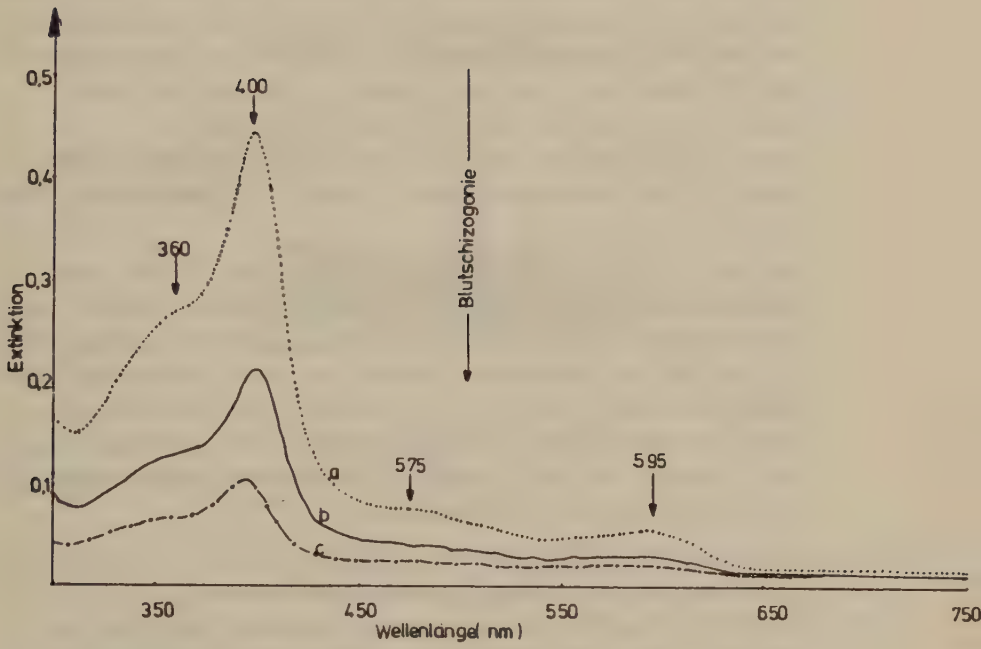


Abbildung 25: Spektren verschiedener Fraktionen der Percoll-gradienten von infizierten (CS) Rattenerythrocyten. Extraktionslösung: 0,1N NaOH in 80 % Ethanol.

a) Fraktion 3 (representativ, Anfang der Blutschizogonie)
b) Fraktion 10 (representativ, Mitte der Blutschizogonie)
c) Fraktion 14 (representativ, Ende der Blutschizogonie)
Zunahme der Fraktionnummer = Steigende Blutschizogonie

4.6. SDS-PAGE-Analyse des Serums im Ablauf der Parasitämie

Während der Blutschizogonie des Malaria-Erregers wird Hämoglobin abgebaut. In CS P. berghei werden die Hämeinheiten als Malaria-Pigment abgelagert, im Gegensatz hierzu bildet der CR Stamm kein oder sehr wenig - höchstens mit dem Elektronenmikroskop feststellbares - Pigment.
Dies würde bedeuten, daß die Hämeinheiten in irgendeiner Form ans Blut abgegeben werden, so daß ein Transportmolekül erforderlich wäre.

Die Analyse des Serums von mit CR infizierten Ratten bei gleichzeitiger Gabe von Chloroquin (85 mg Base/kg/Tag) in der SDS-PAGE wurden zwei neue Proteinbanden beobachtet, die als T-1 und T-2 bezeichnet wurden. T-1 hat ein Molekulargewicht von etwa 57 KD und T-2 von etwa 30 KD (Abb. 26a, 27). Ohne gleichzeitige Chloroquingabe traten diese Banden nicht auf. In Seren von CS P. berghei infizierten Versuchstieren fehlten die beiden Proteinbanden.

Die densitometrische Auswertung der Serum SDS-Polyarcylamid Gelen von den mit einem Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten und mit Chloroquin behandelten Versuchstieren aus Abb. 26a zeigen, daß die Proteine T-1 und T-2 im Serum gesunder (Abb. 26b), gesunder und mit Chloroquin behandelter (Abb. 26c) nicht vorhanden sind, sondern nur im Serum von mit einem Chloroquin-resistenten P. berghei und mit Chloroquin behandelten Versuchstieren gefunden wird (Abb. 26d-f).

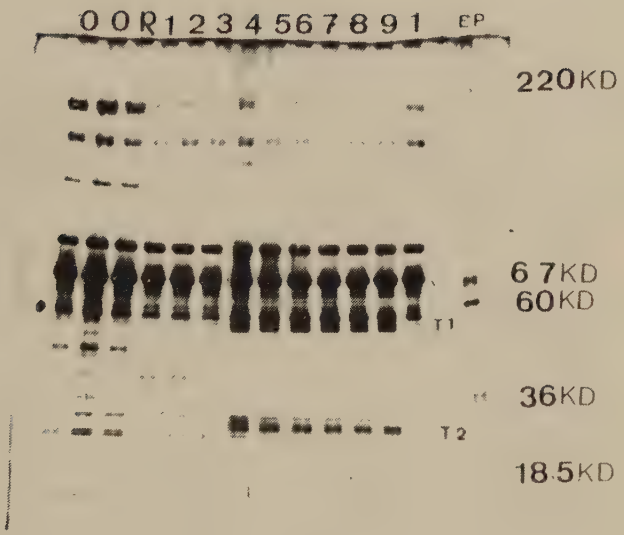


Abbildung 26a: SDS-PAGE vom Serum einer mit Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei infizierten Ratte.

T_1 und T_2: Proteine die gebildet wurden im Ablaufe der Parasitämie unter ständiger Chloroquin-Gabe (Transportproteine für Hämeinheiten ?)

O: Serum von gesunden Ratten

R: Serum von gesunden Ratten, die täglich 85 mg Chloroquin (Base)/Tag/kg Körpergewicht erhalten hatten.

EP: Eichproteine

1, 2 usw. Tage nach der Infektion bzw. Ablaufe der Parasitämie

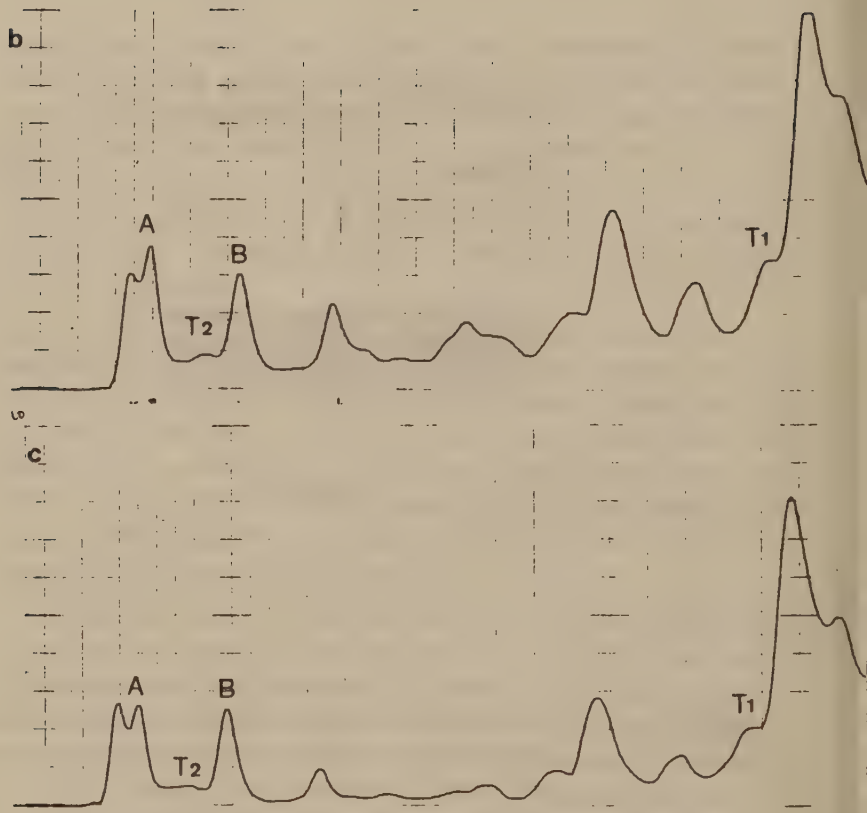


Abbildung 26b + c: Densitometrische Analyse der SDS-PAGE-Gele von Abb. 26a

b: Serum von gesunden Ratten (O)

c: Serum von mit Chloroquin gefütterten (R) gesunden Ratten

Serumproteine A und B
Serumproteine T-1 und T-2
in Abb. 26 d-f

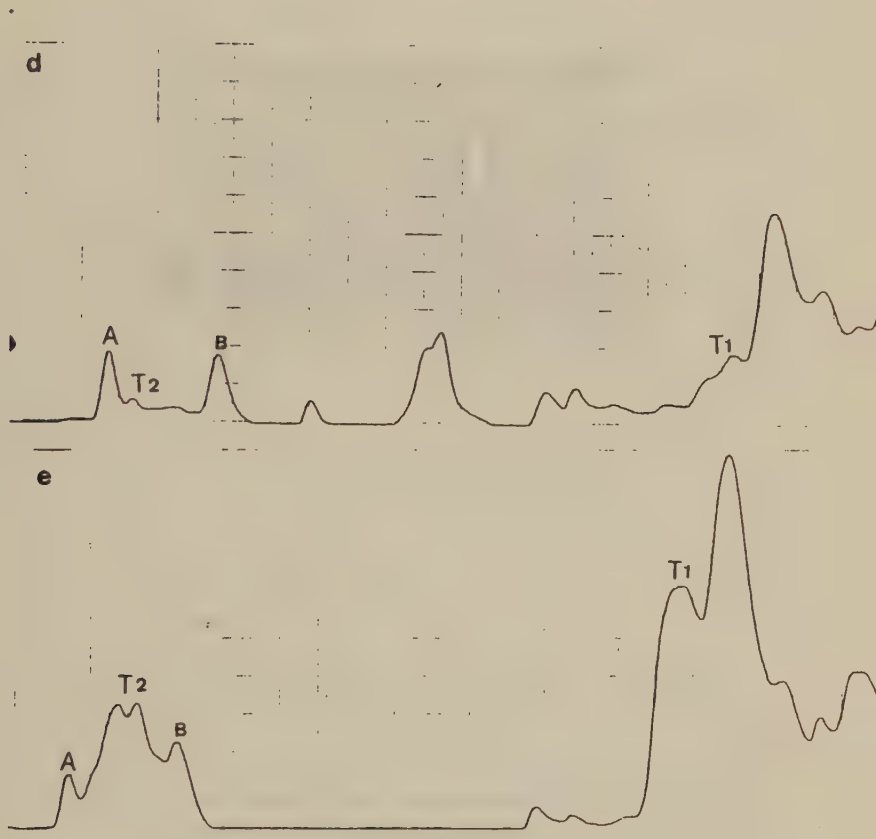


Abbildung 26d+e: Densitometrische Analyse der SDS-PAGE-Gele von Abb. 26a

d-e: Steigende Parasitämie
Serumproteine A und B
Serumproteine T_1 und T_2 die bei einer CR-P.berghei Infektion mit steigender Parasitämie und bei gleichzeitiger Gabe von Chloroquin vermehrt gebildet werden (Abb. 26d-f)

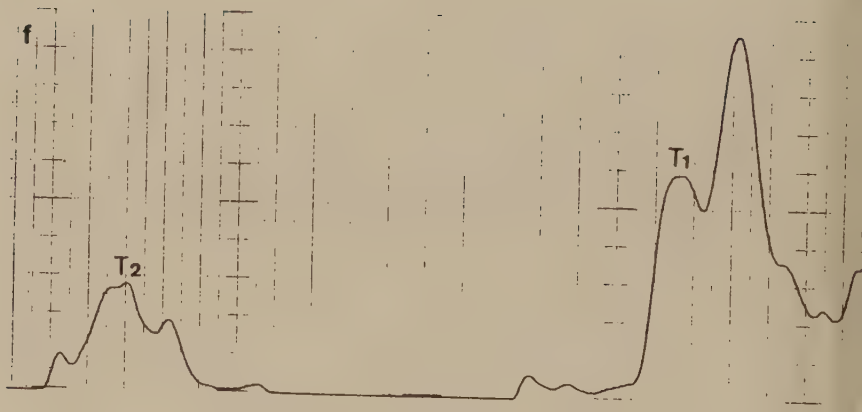


Abbildung 26f: Densitometrische Analyse der SDS-PAGE-Gele von Abb. 26a

b-f: Steigende Parasitämie

A + B: Serumproteine

T_1 + T_2: Serumproteine, die vermehrt gebildet werden bei steigender Parasitämie

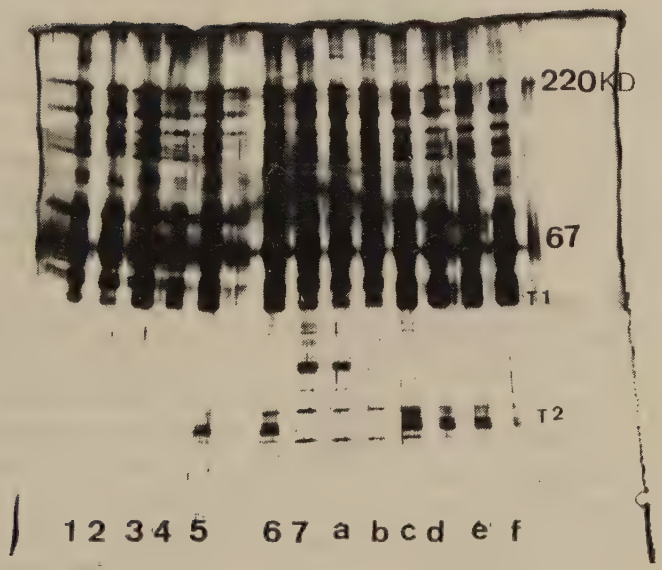


Abbildung 27: SDS-PAGE von Serum einer mit Chloroquin-resistenten (CR) P. berghei infizierten Ratte im Ablaufe der Parasitämie (ein Vergleich zwischen Normalluft- und Unterdruck (3.11.1.)-Behandlung)

T_1 und T_2: Proteine, die gebildet wurden im Ablaufe der Parasitämie.

1-6 : Tage nach der Infektion (steigende Parasitämie). Ratten wurden vor der Infektion in Unterdruck gehalten (4 Tage)

a-f : Steigende Parasitämie. Ratten ohne Unterdruckbehandlung

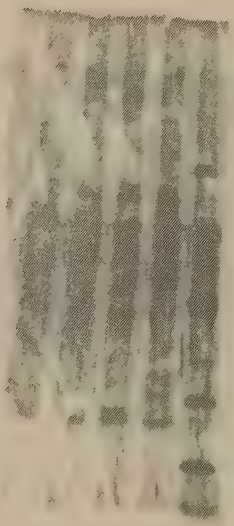


Abbildung 28:
SDS-PAGE von Serum einer mit Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierten Ratte mit steigender Parasitämie.
1: Serum von gesunden Ratten
2 + 3: Serum von mit CS infizierten Ratten (Parasitämie 60%)
4: Serum von mit Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten Ratten ohne Chloroquin-Gabe (Parasitämie 30 %)
EP: Eichproteine

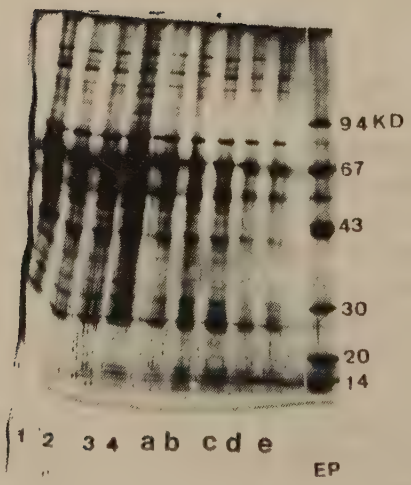


Abbildung 29:
SDS-PAGE von Serum mit Chloroquin-sensible (CS, und -resistenten (CR, a- P. berghei infizierten R
1: Null Parasitämie
2: 33 % Parasitämie
3 + 4: 12 % und 20 % Parasitämie
a-e: steigende Parasitäm in CR Infektion
EP: Eichproteine

4.7. Enzymatischer Abbau von Häm

4.7.1. Messung von parasitärer Hämogygenase

Der Abbau von Hämoglobin im Organismus erfolgt durch zwei Enzyme: Eine Hämoxygenase als Schrittmacher-Enzym, wobei Biliverdin entsteht und dreiwertiges Eisen (Fe^{+++}) und Kohlenmonoxid freigesetzt werden. Biliverdin wird in Anwesenheit von Biliverdin-Reduktase und NAD(P)H zu Bilirubin weiter umgesetzt.
In bisherigen Methoden dient die Bilirubin-Bildung als "index" der Hämoxygenase-Aktivität (Tenhunen et al 1968, Schmid et al 1972, Noguchi et al 1978, Ibrahim et al 1981). Biliburin-Bestimmung durch Chloroform-Extraktion ist unbequem und für Kinetik-Messungen/Untersuchungen sehr ungenau. Desferrioxamin B (Desferal $^{(R)}$), ein natürlicher Eisen-Chelator, bindet dreiwertiges Eisen mit sehr hoher Avidität (10^{31} von Kerbele1964 und Moeschlin 1962). Der Desferal-Eisen(Fe^{+++})-Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Es wurde daher in einer neuen Methode zur Hämoxygenasebestimmung die Freisetzung von dreiwertigem Eisen durch Komplexierung mit Desferrioxamin B gemessen (Abb. 30a). Mit dieser Methode und der von Tenhunen et al (1968) konnte keine Hämoxygenase-Aktivität in CR- und CS-P. berghei gefunden werden.

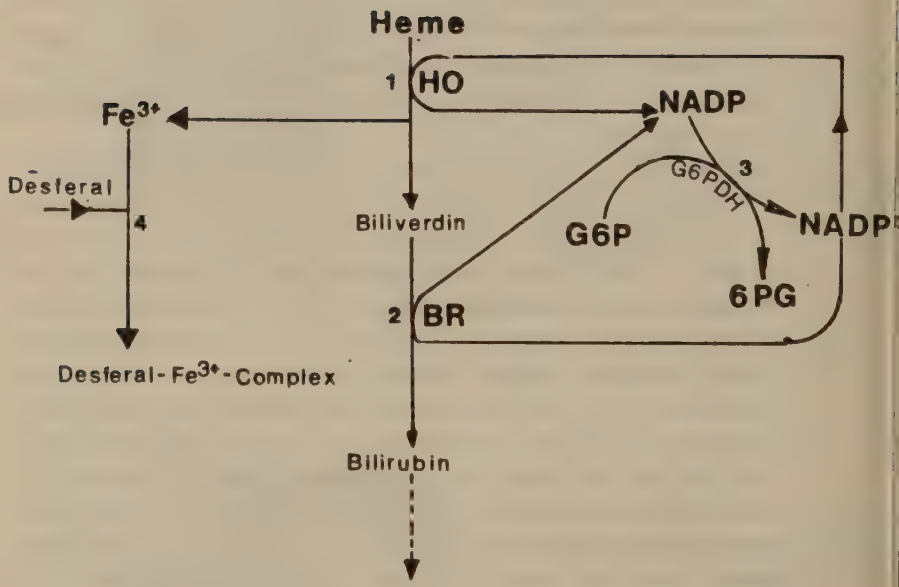


Abbildung 30a: Schematische Darstellung der Bestimmung der Hämoxygenase-Aktivität mit Desferrioxamin B

HO:	Hämoxygenase
BR:	Biliverdinreduktase
1 — 2:	Konventionelle Methode
1 über 4:	In dieser Arbeit beschriebene Methode
G6P:	Glucose-6-Phosphat
6PG:	6-Phosphogluconat

4.7.2. Messung von parasitärer Biliverdin-Reduktase

Der Nachweis von Biliverdin-Reduktase wurde wie in 3.9.4. beschrieben durchgeführt. In infizierten Erythrocyten als auch isolierten Parasiten konnte keine Biliverdinreduktase-Aktivität nachgewiesen werden.

4.7.3. Einfluß der Parasitämie auf Ratten-Leber Biliverdinreduktase

Der Chloroquin-sensible P. berghei-Stamm bildet und lagert abgebautes Hämoglobin als Malaria-Pigment ab. Im Chloroquin-resistenten P. berghei-Stamm fehlt eine solche Ablagerung. Wenn der CR P. berghei in der Lage wäre, Hämeinheiten an das Blut abzugeben, dann müßten die mit CR P. berghei infizierten Tiere mit viel mehr Porphyrinresten belastet sein, als CS-infizierte Tiere. Man müßte infolgedessen eine gesteigerte Induktion der hämabbauenden Enzyme beobachten können.
In der vorliegenden Arbeit wurde ein Anstieg der Ratten-Leber Biliverdinreduktase-Aktivität im Ablauf der Parasitämie in infizierten Ratten festgestellt. Die Zunahme der Enzymaktivität war höher in den mit CR P. berghei infizierten Ratten als in den mit CS infizierten Tieren (Abb. 30b).

4.7.4. Messung des Kohlenmonoxidhämoglobins

In einer hämoglobinreichen Umgebung müßte bei einer parasitären Hämoxigenaseaktivität CO freigesetzt und als Kohlenmonoxidhämoglobin fixiert werden.
Bei der in dieser Arbeit angewandten Methode (3.2.3.) konnte kein Kohlenmonoxidhämoglobin in dem Blut von mit CS und CR P. berghei infizierten Ratten nachgewiesen werden.

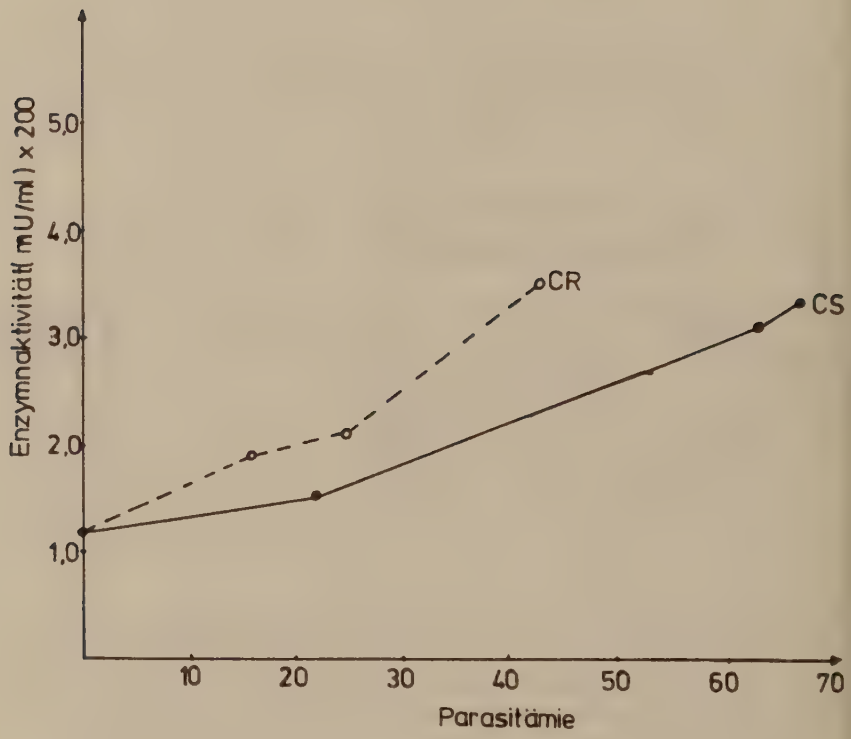


Abbildung 30b: Induktion der Leber-Biliverdinreduktase in mit Chloroquin-resistenten (CR und Chloroquin-sensiblen (CR) P. berghei infizierten Ratten bei steigender Parasitämie

4.8. Untersuchungen zum Malaria-Pigment

Zur Aufklärung des Stellenwertes des Malaria-Pigments in der Malaria-Chemotherapie gehören auch Untersuchungen zu seiner Zusammensetzung und zu seinen biochemischen Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit wurden die Löslichkeit und die Spektraleigenschaften vom Malaria-Pigment untersucht.

Löslichkeit des Malaria-Pigments und anderer Porphyrine bei Zimmertemperatur

Tabelle I

Lösungsmittel/ Substanz	H_2O	1%Triton X-100	0,1m NaOH in 80% Äthanol	2% SDS	1%SDS	0,1% SDS	Chloroform	90% Phenol
Malaria-Pigment	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++
Hämin	-	-	+++	-	-	-	-	+++
Protoporphytin	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

(-) nicht löslich

(+) schlecht löslich

(+++) sehr gut löslich

4.8.1. Spektraleigenschaften des Malaria-Pigments und anderer Porphyrine

Das Spektrum von Malaria-Pigment (in 0,1M NaOH in 80 % Äthanol) zeigt vier charakteristische Absorptionsmaxima (Abb. 31); das erste zwischen 655 nm - 550 nm mit einem Maximum bei 595 nm; das zweite ist flach und erscheint von 540 nm bis 460 nm mit einem Absorptionsmaximum bei 485 nm; der zweiten Absorptionsbande folgt eine dritte Bande von 460 nm bis 310 nm mit einem Maximum bei 400 nm und einer breiten Schulter von 375 nm bis 310 nm, deren Maximum bei 360 nm erscheint.
Hämin (Ferriprotoporphyrin IX:Cl) zeigt ähnliche Spektraleigenschaften in alkalischer Äthanol-Lösung (Abb. 32).
In 90 % phenolischer Lösung von Hämin beobachtet man eine Verschiebung des ersten Absorptionsmaximumx zu langen Wellenlängen (623 nm). Die zweite Absorptionsbande nimmt zu (555 nm - 475 nm) mit zwei Maxima (525 nm und 500 nm). Das Absorptionsmaximum bei 400 nm bleibt, aber die Schulter von 375 nm bis 310 nm (360 nm Maximum) verschwindet. Das Malaria-Pigment in 90 % phenolischer Lösung zeigt ebenfalls solche Spektralveränderungen.
Allerdings zeigt eine Lösung von Malaria-Pigment in 1 % SDS (in dest. Wasser) völlig andere Spektraleigenschaften. Im Gegensatz zur alkalischen und phenolischen Lösung von Malaria-Pigment, erscheint eine auffallende Absorptionsbande zwischen 700 nm und 615 nm (mit einem Absorptionsmaximum bei 645 nm), gefolgt von einer breiten Spektralbande von 600 nm bis 310 nm mit Maxima bei 515 nm, 437 nm, 400 nm und 347,5 nm (Abb. 33). Bei Hämoglobin und Protoporphyrin IX fehlt der Peak von 700 nm bis 615 nm (645 nm als Maximum) (Abb. 34 und 35).

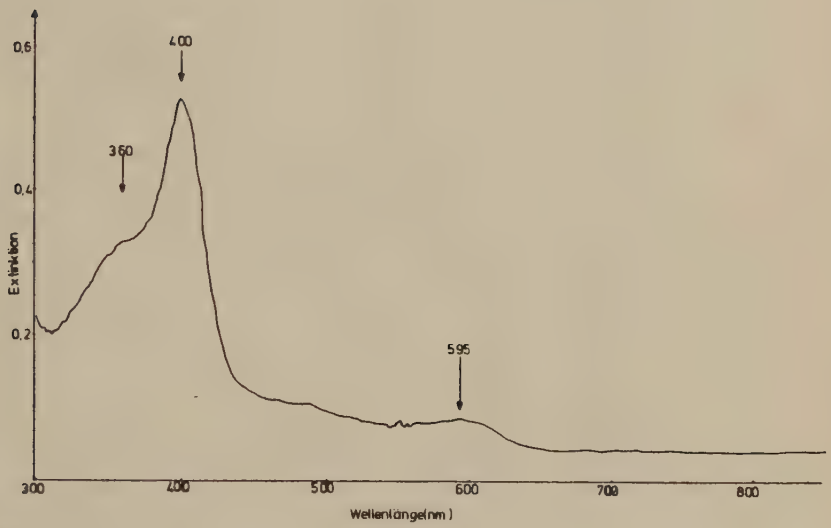


Abbildung 31: Absorptionsspektrum des nach der isolektrischen Fokussierung (IEF) auf der Auftragsstelle liegen gebliebenen schwärzlichen Materials (Malaria-Pigment).
Extraktionslösung: 0,1 N KOH in 80 % Ethanol.

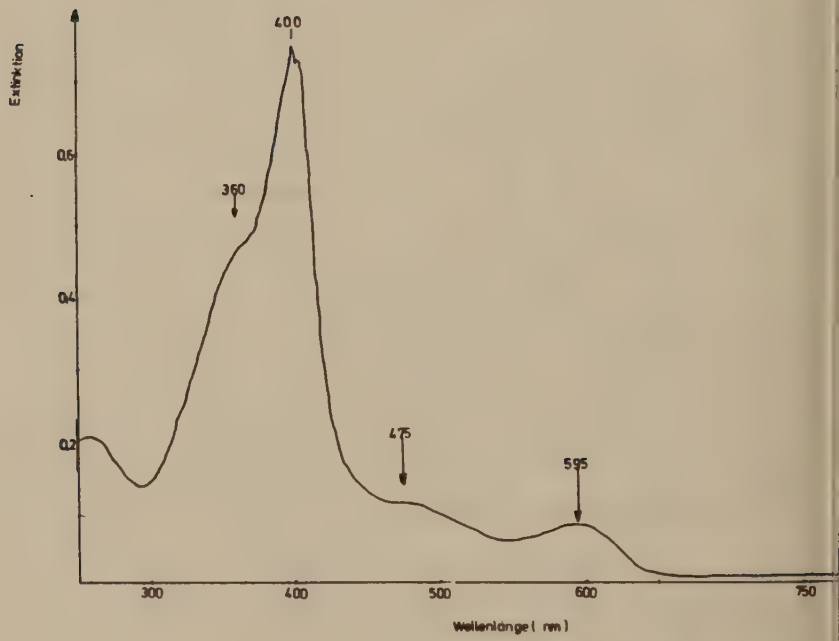


Abbildung 32: Absorptionsspektrum von Hämin (Ferriproto-porphyrin IX-Chlorid)
Extraktionslösung: 0,1N KOH in 80 % Ethanol

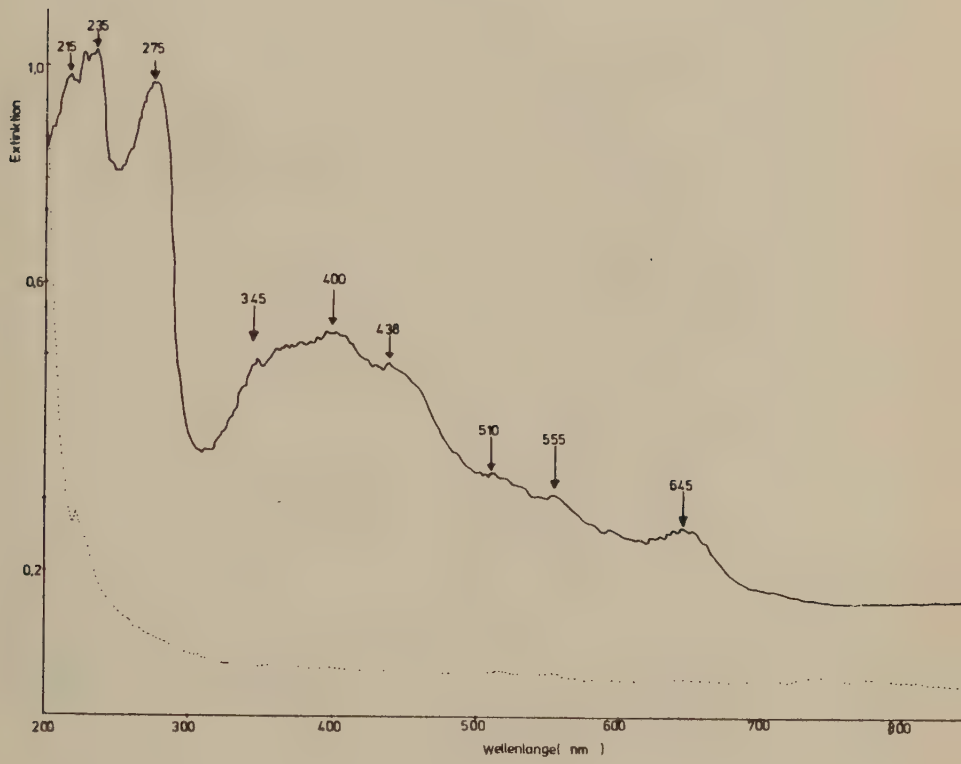


Abbildung 33: Absorptionsspektrum des Malaria-Pigment.
Extraktionslösung: 1,0% SDS-Lösung (H_2O)

(.....) Wässrige SDS-Lösung (1%) als "base line"

(————) Malaria Pigment

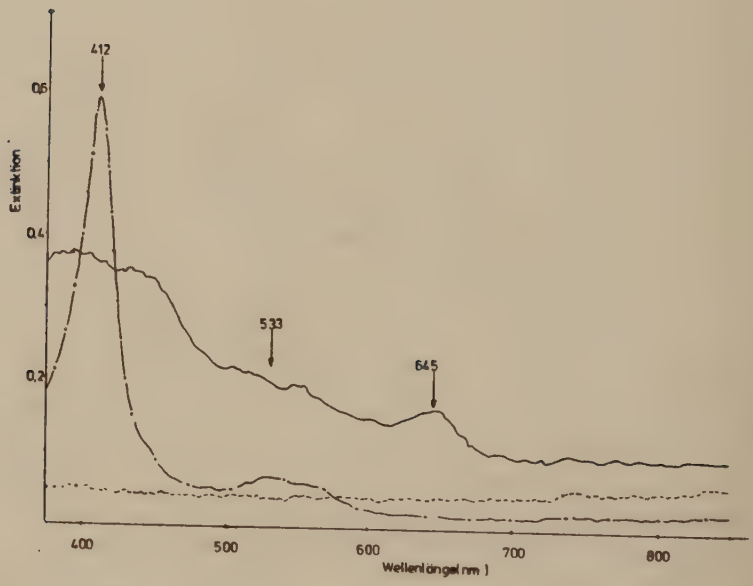


Abbildung 34: Absorptionsspektrum von Malaria-Pigment (——); Erythrocyten Lysat (-.-.-) in 0.2 % SDS-Lösung (H_2O)."Base line" (-----).

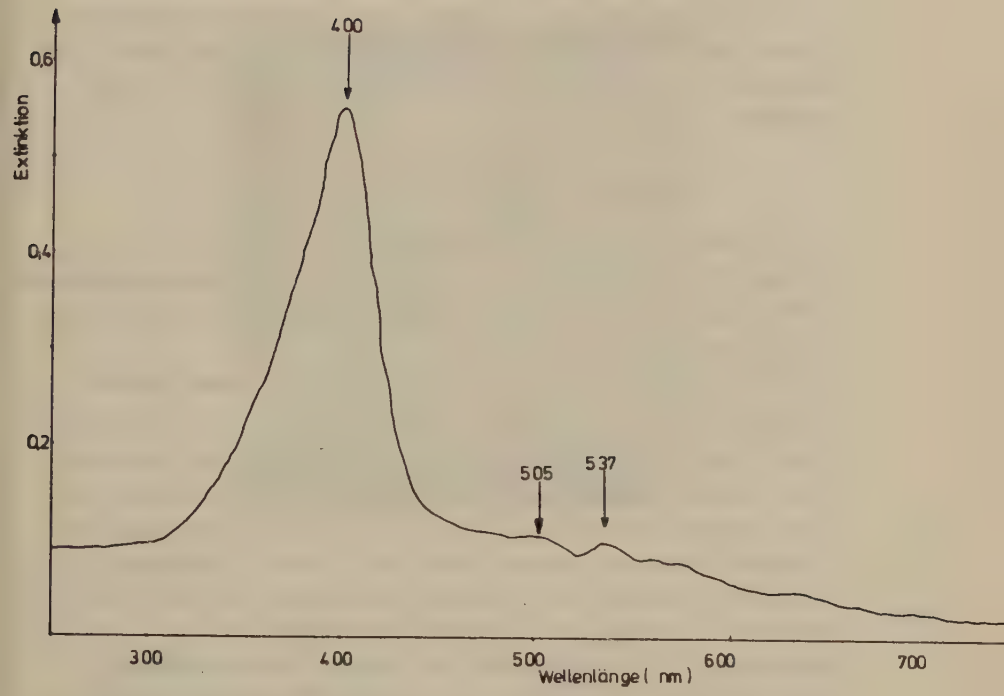


Abbildung 35: Absorptionsspektrum von Protoporphyrin IX in 2 % SDS-Lösung (H_2O)

4.8.2. SDS-PAGE-Analyse des Malaria-Pigments

Mit Hilfe von SDS-PAGE-Analyse des durch IEF isolierten Malaria-Pigments (3.13.2.) können etwa 15 Banden mit Molekulargewichten zwischen 14 KD und 43 KD gefunden werden. In den Kontrollen wurden keine entsprechenden Banden in diesem Bereich gefunden (Abb. 36); ein Zeichen dafür, daß die Banden zwischen 14 KD und 43 KD zum Malaria-Pigment gehören könnten.

4.9. Reversion

Als Reversion wird die Wiederkehr der Pigment-Bildung in einen nicht-pigment-produzierenden Malaria-Stamm bezeichnet, wobei gleichzeitig die Chloroquin-Sensibilität wiederhergestellt wird.
Bei dieser Studie wurden folgende Beobachtungen gemacht:

Wenn man bei einer Infektion mit P. berghei, chloroquinresistenter Stamm in Ratten die tägliche Chloroquin-Dosis (85 mg Base / kg / Tag) absetzt, bildet sich im Laufe der Zeit (Wochen bis Monate) wieder das Malaria-Pigment, ein Merkmal einer Chloroquin-sensiblen Infektion (schwarze Leber und Bildung von Pigment). Gleichzeitig wurde die Chloroquin-Sensibilität wieder hergestellt.
Die Infektion neuer Ratten mit den auf diese Weise "revertierten" Parasiten zeigte einen langsamen Krankheitsverlauf, wenn man die Ratten vom ersten Tag der Infektion an mit Chloroquin (85 mg Base / kg / Tag) behandelt (Abb. 38). Die nicht behandelten Ratten starben an der Krankheit (Abb. 38). Die Leber von Test-Gruppen waren angefärbt (schwärzlich) und Pigment war in Giemsa-gefärbte Ausstriche von Leber und Milz zu sehen.
Nach mehreren Passagen konnte man die infizierten Ratten durch Chloroquin-Behandlung völlig heilen. Eine Zunahme der Chloroquin-Sensibilität im Laufe der Zeit wurde festgestellt (Abb. 37 und 39).

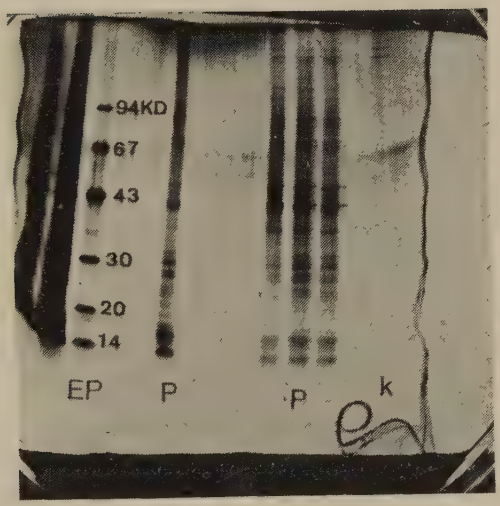


Abbildung 36: SDS-PAGE von isoliertem (3.17.2.) Malaria-Pigment mit anschließender Silberfärbung.

EP: Eichproteine
P: Malaria-Pigment
K: Kontrolle: gesunde Rattenerythrocyten

Die Elektrophorese des Malariapigments in Abb.36 zeigt deutlich, daß das Pigment sich aus einer Reihe höher- und hochmolekularer Moleküle mit kovalenten Bindungen zusammensetzt. Das Pigment ist deshalb mit Sicherheit kein Conglomerat von niedermolekularen Substanzen wie Ferriprotoporphyrine, die nur über intermolekulare Wechselwirkungen zusammengelagert sind.

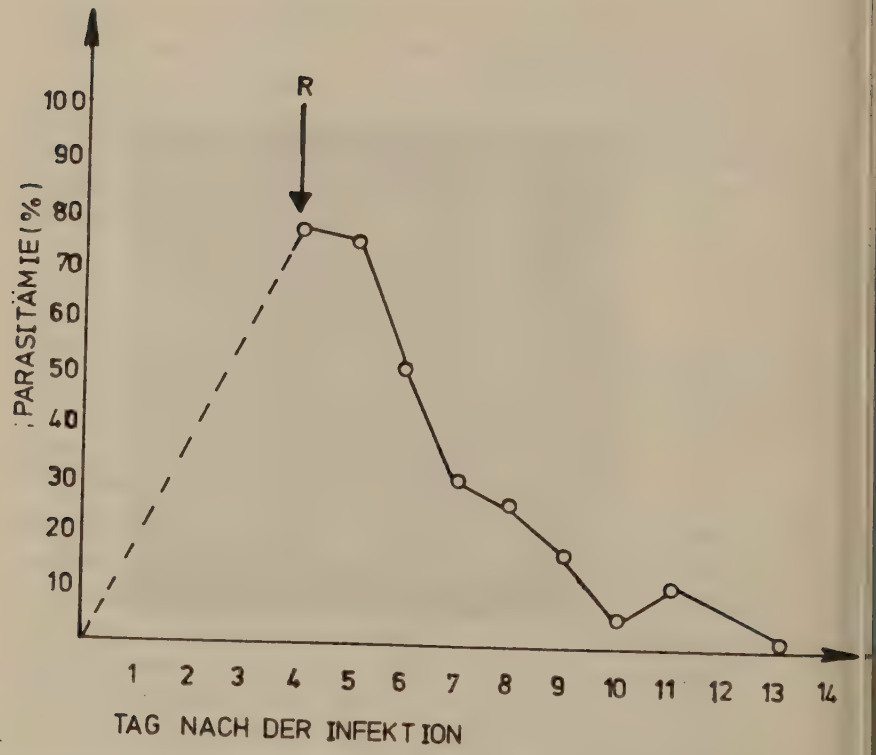


Abbildung 37: Einfluß von Chloroquin auf den Parasitämieverlauf einer CR P.berghei Zellinie, die vorher über 14 Tage ohne Chloroquin in Passage gehalten wurde.

Pfeil: Anfang der Therapie

Die Aufrechterhaltung der Chloroquin-Resistenz ist von der mehr oder weniger kontinuierlichen Stimulation durch Chloroquin abhängig. Sie verschwindet, wenn über eine gewisse Zeit die Zellen nicht unter "Chloroquin-Stress" gehalten werden (Abb.37)

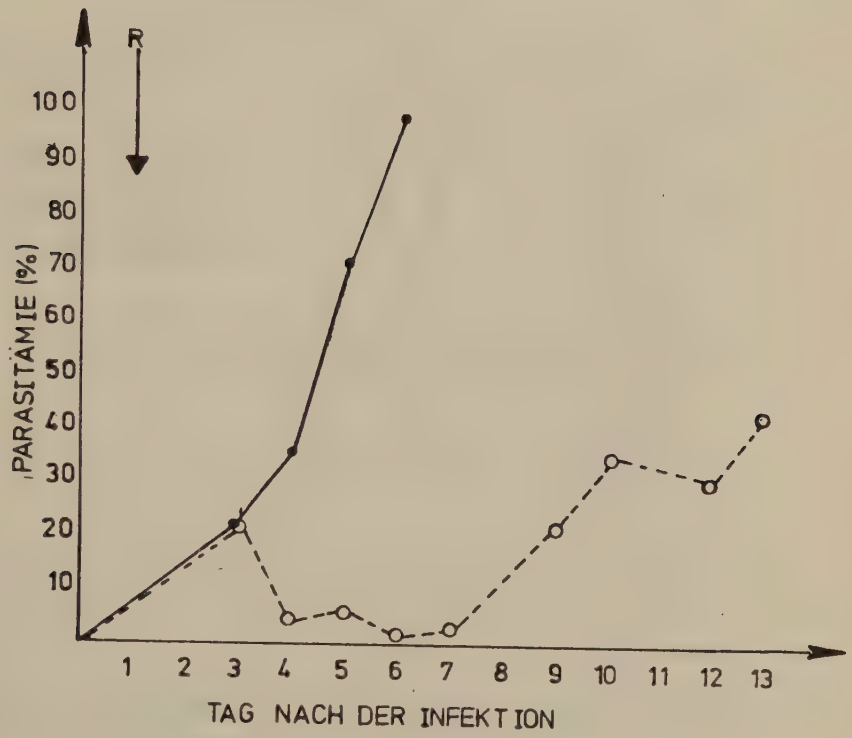


Abbildung 38: Verlauf der Parasitämie in der fünften Passage (etwa 6 Wochen) nach der Reversion (von Abb. 8)

•——• Parasitämieverlauf ohne Chloroquinbehandlung; die Tiere starben an der Infektion.

o- - -o Parasitämie-Verlauf unter Chloroquin-Behandlung (85 mg Base/kg/Tag) ein Tag nach der Infektion.

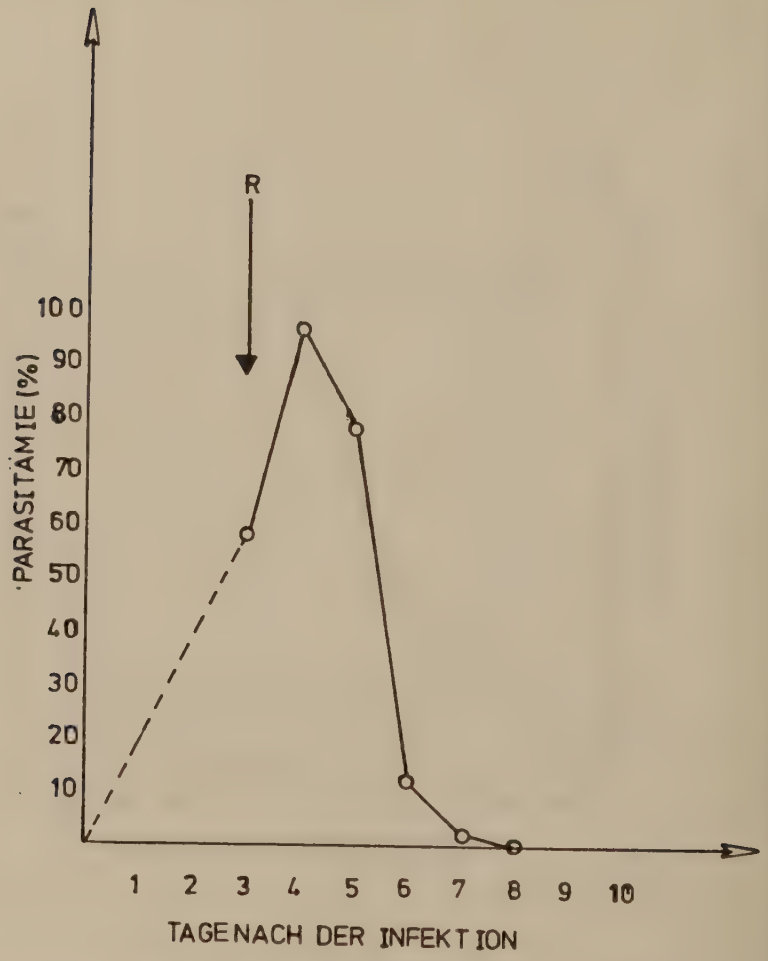


Abbildung 39: Verlauf der Parasitämie mehrere Passagen (etwa 20 Wochen) nach der Reversion (von Abb. 8)

Eine Zunahme der Chloroquin-Empfindlichkeit wird beobachtet (Vergleich Abb. 37).

4.10. Empfindlichkeit der zweiten Chloroquin-freien Linie gegenüber Chloroquin

Die Chloroquin-freie Linie (CFL-2 von Abb. 8) blieb für längere Zeit (7 Monate) ohne Chloroquin-Behandlung resistent gegen Chloroquin und es wurde keine Änderung der Art des Befalls (Reticulocyten) in diesem Zeitraum beobachtet. Die Parasiten wurden allerdings nach 8 Monaten, ohne ihre Befall-Art zu ändern und ohne sichtbares Pigment zu bilden, sensibel gegenüber Chloroquin (Abb. 40).

4.11. Chloroquin-Stoffwechsel in Chloroquin-resistenten und -sensiblen Plasmodium berghei (in vivo) und Plasmodium falciparum (in vitro)

4.11.1 Chloroquin-resistente (CR) und -sensible (CS) Plasmodium berghei (in vivo)

Wenn die Malaria-Parasiten in der Lage wären, Chloroquin zu verstoffwechseln, dann müßte(n) diese(e) Abbauprodukt(e) im Harn der infizierten Tiere erscheinen. Die Analyse des Harns (3.19.) von mit CR oder CS P. berghei infizierten Ratten durch Dünnschichtchromatographie (DC) und dessen Betrachtung unter UV-Licht, zeigte keinen Unterschied (Abb.41). Es wurde nur die unveränderte Substanz ausgeschieden.

4.11.2. Chloroquin-resistente (CR) und -sensible (CS) Plasmodium falciparum (in vitro)

Mit ^{14}C-Chloroquin wurde festgestellt, daß der CS P. falciparum Stamm (T9-96) mehr Chloroquin konzentriert als der entsprechende CR Stamm (T9-102). Nach 24 Stunden Inkubation der Parasiten mit chloroquinhaltigem Medium konnte man 59 % bzw. 77 % des eingesetzten Chloroquins in den Überständen von CS bzw. CR-Kulturen feststellen und 41 % bzw. 23 % in den Zellen gefunden werden (Abb. 42a-c).

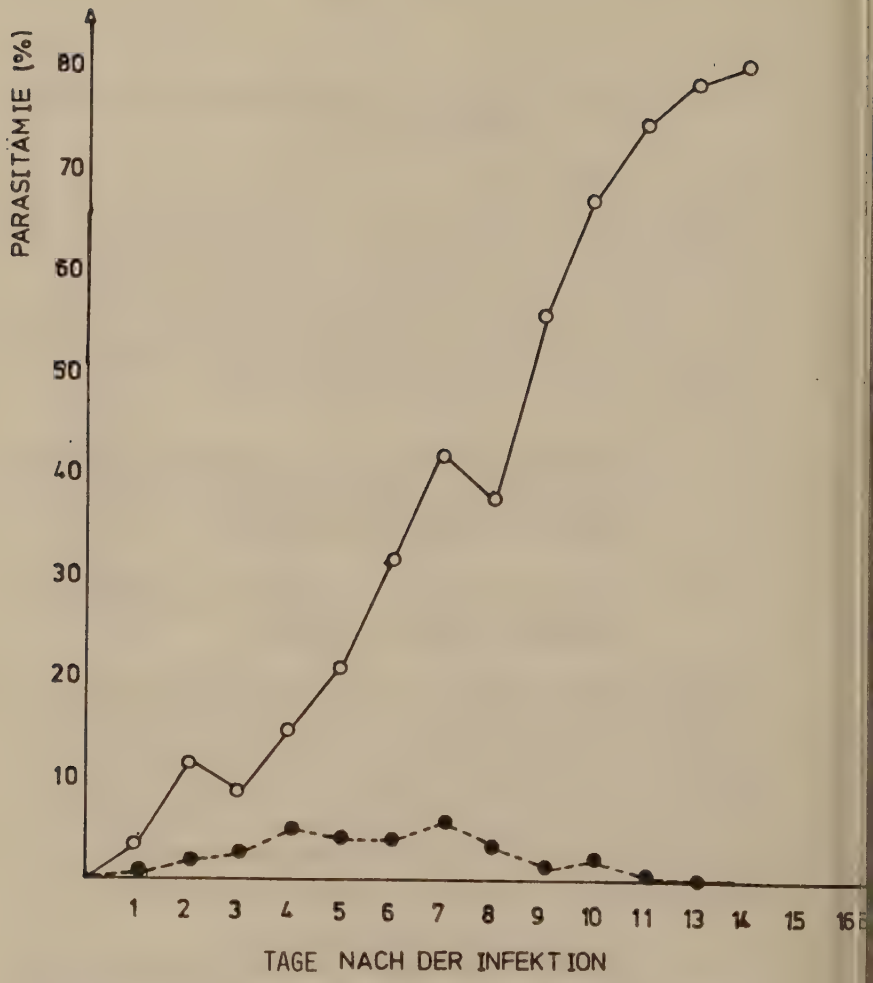


Abbildung 40: Verlauf der Parasitämie in der Chloroquin-Freie-Linie-2 (CFL-2 von Abb. 8) 8 Monate nach deren Entstehung (Selektion).

o———o: Kontrolle, ohne Chloroquin-Behandlung

●-----●: Versuch, mit Chloroquin-Behandlung

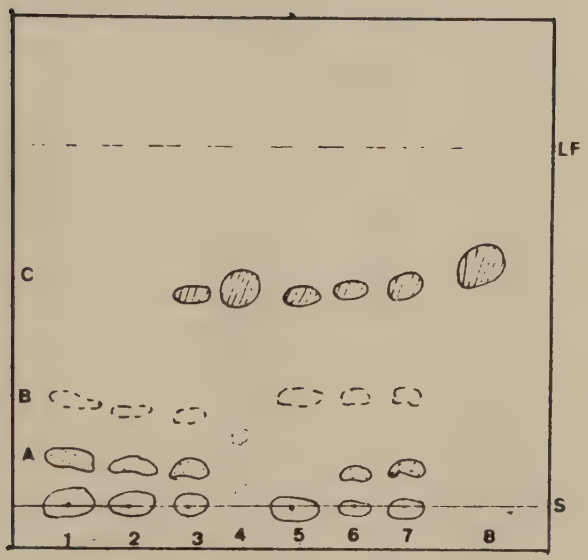


Abbildung 41: Dünnschichtchromatographie des Harns von mit Chloroquin-sensiblen (CS) und Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten Ratten. Betrachtung unter UV (246 nm)

S: Start; LF: Lauf-Front; C: Chloroquin; 1-8: Urin-Proben; 4 u. 8: Chloroquindiphosphat; 1,3,6: Urin von mit CR infizierten Ratten ohne (1) und mit (3,6) Chloroquin-Behandlung; 2,5,7: Urin von mit CS infizierten Ratten ohne (2) und mit (5,7) Chloroquin-Behandlung.

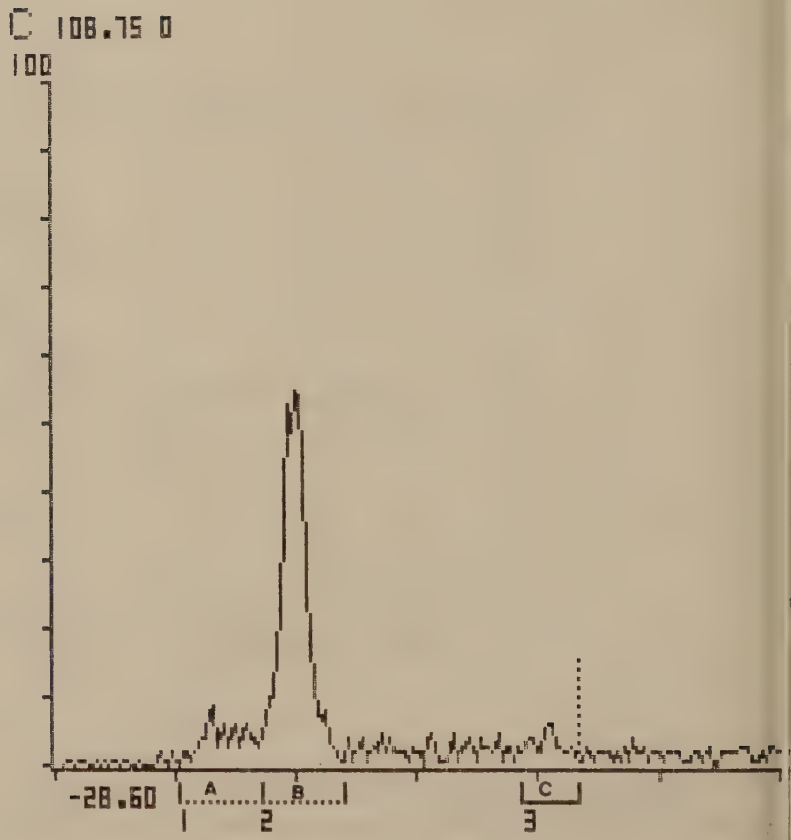


Abbildung 42a: Chloroquinstoffwechsel in Chloroquin-sensiblen P. falciparum.
24 h nach der Inkubation mit ^{14}C-Chloroquin, wurde das Kulturmedium abgesaugt, experiert, in wenig Wasser aufgenommen und chromatographiert. Verteilung der Radioaktivität wurde analysiert (Berthold Linear Analyser)

A: Auftragsstelle

B: Mutter-Substanz (Chloroquin unverändert)

C: Zerfallprodukt?

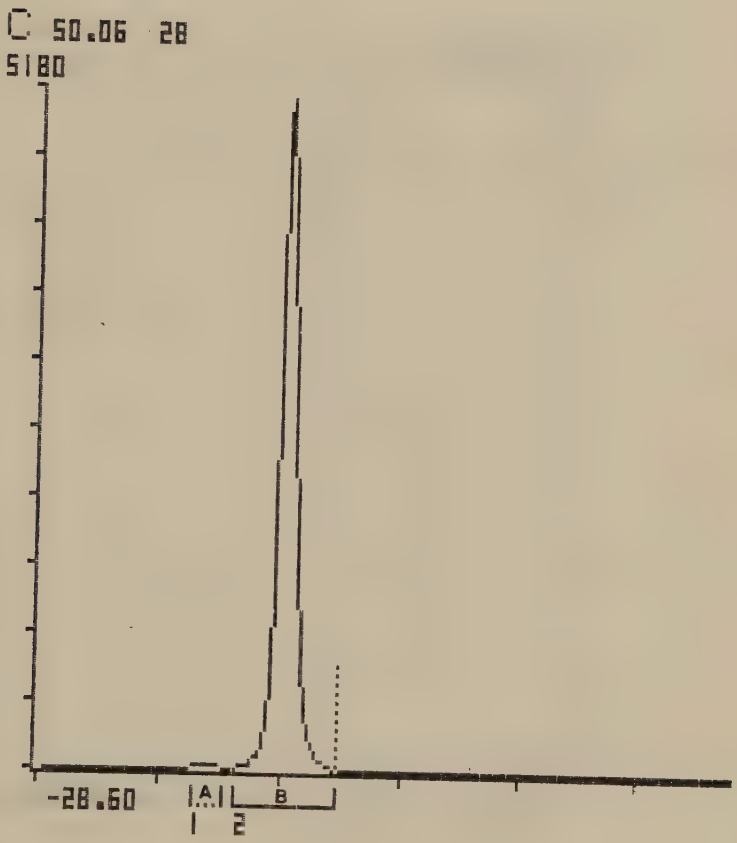


Abbildung 42b: Chloroquinstoffwechsel in Chloroquin-resistenten P.falciparum.
24 h nach der Inkubation mit ^{14}C-Chloroquin, wurde das Kulturmedium abgesaugt, experiert und in wenig Wasser aufgenommen chromatographiert. Die Verteilung der Radioaktivität auf der DC wurde analysiert (Berthold Linear Analyser)

A: Auftragsstelle

B: Mutter-Substanz (Chloroquin unverändert)

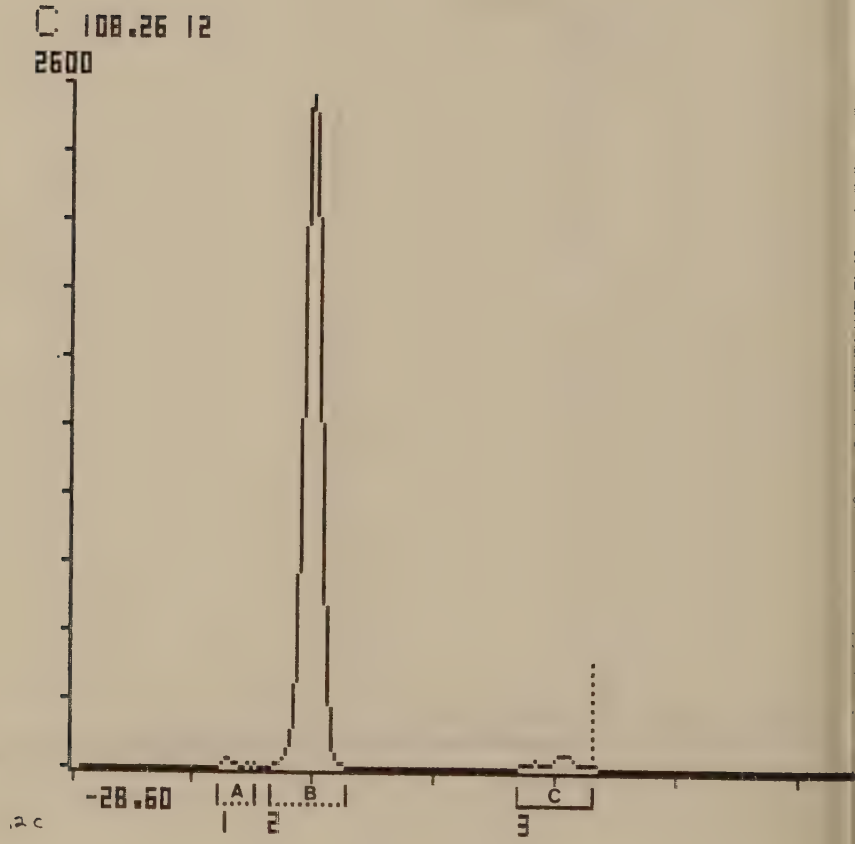


Abbildung 42c: Chromatogram von ^{14}C-Chloroquin

A: Auftragsstelle

B: Mutter-Substanz (unveränderte Chloroquin)

C: Zerfallprodukt?

4.12. Isoenzym-Muster ausgewählter Enzyme in Chloroquin-resistenten und -sensiblen Malaria-Parasiten (P. berghei und P. falciparum)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Aktivitätsfärbungen (3.10.) von Enzymen deuten auf biochemische Unterschiede in den CS und CR Stämmen von Malaria-Parasiten hin (Tabelle II, Abb. 41).

Identifizierte Isoenzyme

Herkunft	GPI	G6PD	6PGDH	LDH
Ratte Erythrozyten	4	2	1	4
P. berghei CS	3	1	3	3
P. berghei CR	2		3	2

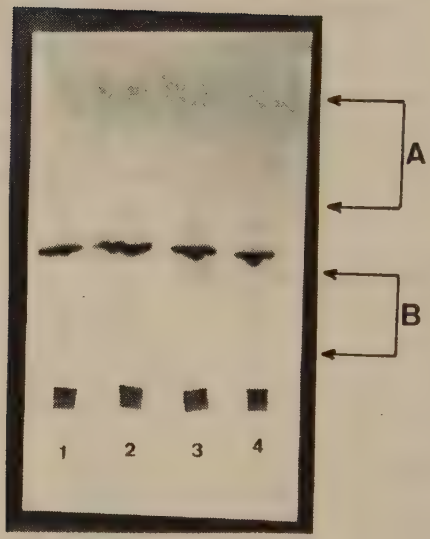


Abbildung 43a: Aktivitätsanfärbung der Glucose-Phosphat Isomerease (GPI) aus mit verschiedenen P. falciparum Stämme infizierten Human-erythrocyten.

1	Stamm KI (Resistenzgrad II)
2	Stamm KII (Resistenzgrad III)
3	T9-102 Chloroquin-resistent
4	T9-96 Chloroquin-resistent
A	Wirtenzyme
B	Parasitäre Enzyme

Die verschiedenen Chloroquin-resistenten P. falciparum zeigen Unterschiede in ihrem Isoenzymmuster der Glucose-6-Phosphat-Isomerase. Insbesondere der Stamm T9-102 zeigt ein deutliches Enzymmuster im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

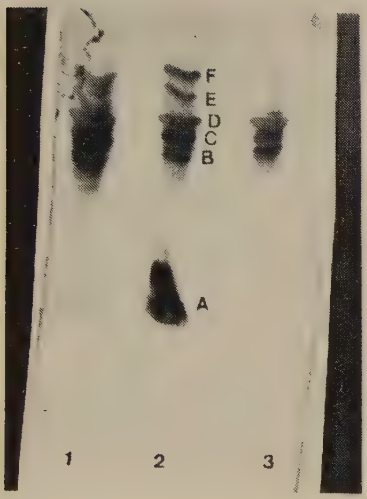


Abbildung 43b: Aktivitätsfärbung der Glucose-Phosphat-Isomerase aus mit Chloroquin-resistent bzw. Chloroquin-sensiblen P. berghei infizierten Rattenerythrozyten.

1 Chloroquin-resistent (CR)
2 Chloroquin-sensible (CS)
3 Uninfizierte Rattenerythrozyten
B,C und D: Erythrozyten Isoenzyme
A,E und F: Parasitäre Isoenzyme
A: ist nur in CS vorhanden

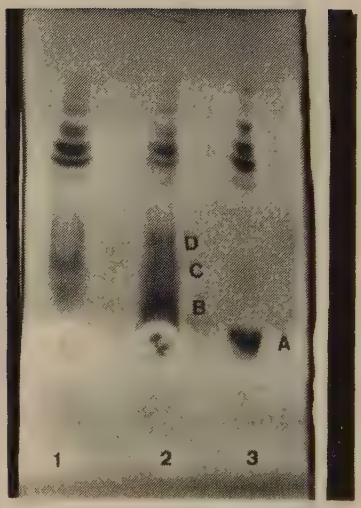


Abbildung 43c: Aktivitätsfärbung der 6 Phosphogluconat-Dehydrogenase aus mit Chloroquin-resistente (CR) und Chloroquin-sensible P. berghei infizierten Rattenerythrozyten.

1 Chloroquin-resistente P. berghei

2 Chloroquin-sensible P. berghei

3 Nicht infizierte Rattenerythrozyten

Wirtszellenzym (A) verdautbar während Blutschizog

B,C und D: Parasitäre Isoenzyme

Abbildung 43d: Aktivitätsfärbung der Lactat-Dehydrogenase aus mit Chloroquin-resistente (CR) und Chloroquin-sensiblen P. berghei infizierten Rattenerythrocyten.

1 Chloroquin-resistente P. berghei
2 Chloroquin-sensible P. berghei
3 Nicht infizierte Rattenerythrocyten
A,B und C: Parasitäre Isoenzyme, A nur in CS vorhanden
D,E und F: Erythrozytäre Isoenzyme

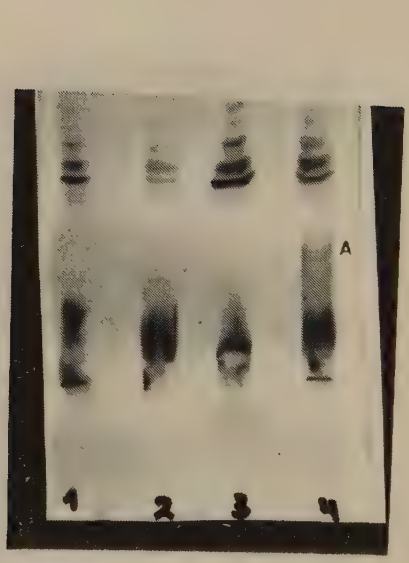


Abbildung 43e: Aktivitätsfärbung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus mit Chloroquin-resistenten (CR) und Chloroquin-sensiblen (CS) P.berghei infizierten Rattenerythrocyten.

1 Nicht infizierte Rattenerythrocyten
2 Chloroquin-sensible P.berghei (alte Probe, 4 Tage alt)
3 Chloroquin-sensible P.berghei (frische Probe)
4 Chloroquin-resistente P.berghei.

Isoenzym A nur in CR P.berghei zu sehen.

5. DISKUSSION

Eine effektive Chemotherapie muß darauf gerichtet sein, den Parasit zu erreichen, ohne daß der betroffene Organismus geschädigt wird. Im allgemeinen ist die Selektivität von chemotherapeutischen Mitteln durch eines oder mehrere der folgenden drei Prinzipien bestimmt:

1) Eine bevorzugte Akkumulation im Erreger.
2) Ein gezielter Angriff in dem biochemischen System des Erregers.
3) Eine Reaktion mit Zellbestandteilen, die nur im Krankheitserreger vorhanden sind (Albert, 1975).

Der kurz- oder langzeitige Erfolg der Malaria-Chemotherapie muß deshalb davon abhängen, wieviel Kenntnisse über den Metabolismus von Wirt und Parasit vorhanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden neben den biochemischen Untersuchungen noch detaillierte morphologische Untersuchungen durchgeführt.

Der NK65 Chloroquin-sensible (CS) und Chloroquin-resistente (CR) P. berghei Stamm unterscheidet sich in einer Reihe von Faktoren.
Beim CS-P. berghei verläuft die Infektion in der jungen Ratte schnell und ist innerhalb von 5 Tagen tödlich (Abb. 9). Es werden ferner sowohl junge als auch reife Erythrocyten vom CS-Stamm befallen; in infizierten Erythrocyten sind lichtmikroskopisch Pigmentaggregate jedoch nur in den infizierten reifen Erythrocyten zu beobachten. Im Gegensatz hierzu ist der Ablauf der Parasitämie bei Infektionen mit dem Chloroquin-resistenten P. berghei "biphasisch", relativ langsam und sie heilt spontan ab (Abb. 9).
Vom resistenten Stamm werden ausschließlich junge Erythrocyten (Retikulocyten) befallen (Abb. 9a).
Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Autoren (Walliker et al 1976, Peters 1968, Wood et al 1984, Jacobs 1965).

Da der CS-P. berghei sowohl junge als auch reife Erythrozyten befällt, stellt sich daher die Frage, ob der Befall von jungen und reifen Erythrocyten die Chloroquin-Wirkung beeinflußt.
Da eine Chloroquinbehandlung einer CS Infektion, bei der junge und reife Erythrocyten befallen werden, zu einer völligen Heilung ohne Wiederkehr der Parasiten im Blut führt, ist ein Hinweis dafür gegeben, daß die Chloroquin-Wirkung nicht durch das Alter der Wirtserythrocyten beeinflußt wird.

Wegen der Tatsache, daß bei einer CS-Infektion eine Pigment-Bildung nur in reifen Erythrocyten stattfindet, müßte man annehmen, daß eine Pigment-Bildung auch von dem "Micro-enviroment" innerhalb dessen der Parasit sich befindet, abhängig sein könnte. Dieses Postulat wird von den Arbeiten von Howells et al (1968) und Peters (1968) unterstützt.

Die Arbeiten von Sergent und Poncet (1959), Peters (1964) und Jacobs (1965) zeigen, daß eine verminderte Virulenz immer mit der Erscheinung von einer Chloroquin-Resistenz eng verbunden ist. Als Erklärung zu dieser verminderten Virulenz in der CR-Infektion, postulierte Peters (1970), daß nach der Infektion mehrere Tage vergehen, bevor das hämatopoetische System in die Lage versetzt wird, das Blut mit neuen jungen Erythrocyten aufzufüllen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen jedoch, daß die Reticulozyten-Produktion nicht als die einzige Ursache für die etwa 21 Tage dauernde Spontanheilung angesehen werden kann, weil in späteren Phasen der Infektion die Reticulocytenzahl beträchtlich zunimmt; von 8 - 15 % am Anfang der Infektion bis zu über 60 % kurz vor der Spontanheilung. Es müssen weitere Faktoren vom Parasiten oder vom Wirt (Erythrocyten Population) gefordert werden.

Zum Hämoglobinabbau

Der Malaria-Parasit ist das haupthämotrope Pathogen des Menschen (Pasvol und Wilson 1982). Die Vorteile für den Parasiten als einen intra-erythrocytär wachsenden Organismen sind:

1) Der Erythrocyt dient als Stickstoff- und Kohlenstoff-Lieferant (Jung et al 1984).
2) Der Erythrocyt ist für die Überträgermücken sehr leicht verfügbar und
3) möglicherweise bietet der Erythrocyt dem Parasiten einen Schutz gegen das Abwehrsystem des Wirts.

Naheliegend scheint die Bereitstellung von Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen (Aminosäuren) aus dem Stroma des Erythrocyten von großer Wichtigkeit zu sein. Hämoglobin macht etwa 95 % des gesamten Erythrocytstromaproteins aus und ist daher für den Parasiten die wichtigste Nahrungsquelle. Bis jetzt sind viele Studien über den Katabolismus von Hämoglobin durchgeführt worden. Diese Studien beschäftigen sich mit dem Abbau des gesamten Hämoglobins (Groman 1951, Fulton und Grant 1956, Sherman und Tanigoshi 1970, Theakson et al 1970, Hempelmann 1977). Es sind erwartungsgemäß proteolytische Enzyme in den verschiedensten Malaria-Erregern entdeckt worden; Moulder und Evans (1946) identifizierten proteolytische Enzyme aus Extrakten von P. gallinaceum mit pH-Optima von 6,5; Cook et al (1961, 1969) berichteten über die Hämolyse von denaturiertem Hämoglobin mit Zell-Extrakten aus P. berghei und P. knowlesi und fanden zwei Proteasen; eine alkalische Protease (die Haupt-Protease pH 7-8) und einen kleinen Anteil an saurer Protease (pH 4-5) . In den letzten Jahren haben Levy und Chou (1973, 1974, 1975), Levy et al (1974), Chan und Lee (1974) eine Cathepsin-D-ähnliche Protease aus P. berghei, P. knowlesi und P. falciparum identifiziert. Es sind auch zwei weitere Proteasen, Endoarylamidase und Aminopeptidase identifiziert worden (Charet et al 1980, Gyang et al 1982, Aissi et al 1983).
Der Hämoglobinabbau durch den Parasiten hat zur Zeit eine größere Bedeutung erlangt, nicht nur weil er für den Parasiten eine wesentliche Energiequelle ist, sondern auch, weil er einen zentralen Punkt der Diskussion um den Mechanismus der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz in der Malaria-Prophylaxe darstellt.

Es wird postuliert, daß Ferriprotoporphyrin IX (FP), ein mögliches Abfallprodukt aus dem Hämoglobinabbau, in der Lage ist, einen toxischen (lytischen) Chloroquin-FP-Komplex zu bilden, der dann den Parasiten selektiv vernichtet (Fitch und Chevli 1981).
Als Erklärung zur Chloroquin-Resistenz in P. berghei nahm Fitch (1983) an, daß der Chloroquin-resistente Stamm kein Hämoglobin abbaut, daß deshalb kein FP anfällt und Chloroquin daher nicht wirken kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Hämoglobinabbau auf der Ebene der Isoproteine des Hämoglobins in mit Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten P. berghei infizierten Rattenerythrozyten untersucht. Hierbei stand neben dem Abbau der verschiedenen Isohämoglobine der Ratte, das Schicksal des bei dem Hämoglobinabbau freigesetzten FP bzw. des im FP enthaltenen Eisens im Vordergrund.
Hierzu wurden die Rattenhämoglobine in vivo mit ^{59}Fe radioaktiv markiert. Die ^{59}Fe markierten Versuchstiere wurden anschließend mit CR und CS P. berhei infiziert und die Zellen nach dem Stadium der Blutschizogonie des Parasiten getrennt und analysiert.
In der IEF der verschiedenen Stadien der Blutschizogonie von CR und CS-Zellen, zeigte sich zunächst, daß vom CR und CS-Stamm Hämoglobin gleichermaßen abgebaut wird (Abb. 18,19).
Überraschend war, daß bei den hier verwendeten Versuchstieren etwa 13 verschiedene Isohämoglobine existieren (Abb. 18, 19), die im Ablauf der Blutschizogonie bis auf das Isohämoglobin E, von CS und CR Stamm alle gleichmäßig abgebaut werden (Abb. 17)
Bei dem Isohämoglobin E handelt es sich möglicherweise um ein an die Innenseite des Wirtserythrocyten gebundenes Hämoglobin oder um eine proteasenresistente Hämoglobinvariante.
Bei der autoradiographischen Analyse der IEF Gele der CR- und CS P. berghei ist neben den bereits erwähnten Isoproteinen

des Rattenhämoglobins das sogenannte Malariapigment und eine ^{59}Fe markierte, negativ geladene Bande X von Interesse (Abb. 20, 21)

Das Malariapigment ist in der IEF unbeweglich und bleibt auf der Auftragstelle liegen. Es enthält Eisen und zeigt eine positive Berliner Blau Reaktion.
Dieses Pigment wird in den mit CS infizierten Erythrocyten während der Blutschizogonie gebildet und in der Zelle abgelagert (Abb. 20).
Der Anteil des im Pigment gebundenen und an der Auftragstelle liegen bleibenden Eisens am Gesamteisen der Zelle beträgt am Anfang der Blutschizogonie von CS-P. berghei ca. 5 % und erhöht sich bis zum Ende der Blutschizogonie auf 65 %, die Erhöhung der ^{59}Fe-Radioaktivität im Pigment entspricht in etwa den aus der Abnahme in den Hämoglobinbanden (Abbau des Hb) zu erwartenden Werten (Abb. 20). Das Gesamteisen bleibt demnach in den CS-infizierten Erythrocyten im Ablaufe der Blutschizogonie weitgehend konstant.
Im Gegensatz hierzu wird bei CR-P. berghei an der Auftragstelle im Pigment lediglich etwa 5 - 10 % der aus dem Hämoglobinabbau zu erwartenden ^{59}Fe gefunden (Abb. 21).
Beim CR Stamm ist auf Fokussierungsgelen zusätzlich im sauren Bereich eine Bande X zu beobachten, die am Anfang der Blutschizogonie etwa 2% am Ende etwa 15% der zu erwartenden Gesamtradioaktivität beträgt. Das Gesamteisen im CR P.berghei infizierten Erythrocyten nimmt im Ablauf der Blutschizogonie ab (Abb. 19 und 24).
Es bleibt jedoch offen, in welchem Zusammenhang die Bande X mit der Chloroquin-Wirkung bzw. mit der Chloroquin-Resistenz steht, oder ob irgend ein anderer Zusammenhang mit dem Parasitenstoffwechsel besteht. Da diese Bande X aber bei dem CS- P. berghei infizierten Erythrocyten nicht in nennenswertem Umfang zu finden ist, dürfte doch ein direkter Zusammenhang dieser Bande X mit der Chloroquin-Resistenz bestehen.

Die Bestimmung des Gesamthämins pro infizierten Erythrocyten im Ablauf der Blutschizonie, zeigt, daß das Hämatin (FP) im CS infizierten Erythrocyten konstant bleibt (Abb. 19), während es beim CR-Stamm abnimmt (Abb. 24). Wood et al (1984) fanden, daß in CR-parasitierten Erythrocyten die "mean corpuscular hämoglobin concentration" (MCHC) 2- bis 3-mal niedriger liegt als in den entsprechenden sensiblen Stämmen.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse besteht daher kein Zweifel, daß die CR-Zell-Linie ebenso wie der CS-Stamm Hämoglobin abbaut, im Gegensatz zu diesem aber das dabei freigesetzte FP nicht im Pigment "entgiftet", sondern in der Lage ist, es in irgend einer Form aus der Zelle hinaus zu transportieren: eine Annahme, die von anderen Autoren unterstützt wird (Wood et al 1984; Slomangetal 1984). Allerdings konnten Yayong et al (1984) durch Mössbauerspektroskopie, keinen Unterschied im Eisengehalt von CS und CR-Stämmen von P. berghei finden.

Wenn das aus dem Hämoglobinabbau freigesetzte Ferriprotoporphyrin IX der Rezeptor für Chloroquin ist - wie Chou et al (1980) es fordern, dann beruht die Chloroquin-Resistenz jedenfalls nicht auf einem Verzicht des Parasiten, Wirtzellprotein d.h. Hämoglobin zu katabolisieren (wie Fitch et al 1983, annehmen), da es sich in der Arbeit gezeigt hat, daß auch der CR-P. berghei seine Wirtszelle abbaut und damit FP freisetzt.
Der Unterschied zwischen CR und CS P. berghei besteht darin, daß der CS-Stamm das FP in Form von Malaria-Pigment entgiftet und der CR-Stamm FP über einen unbekannten Mechanismus aus der Zelle heraustransportiert.
Theoretisch kommen für den Abtransport des FP zwei mögliche Wege in Frage: der Abbau durch Hämoxigenasen/Bilirubinreduktasen und die Elimination des intakten Moleküls.

Hämin (Ferriporotporphyrin IX) wirkt hämolytisch auf Mäuse-Erythrozyten (Chou und Fitch 1980, 1981) und ist in der Lage, sich in Vesikeln von Phospholipiden anzureichern (Shviro et al 1982).

Angesichts dieser Toxizität ist es für den Parasiten generell notwendig, die während der Blutschizogonie frei werdenden Hämeinheiten sofort zu entgiften durch intrazelluläre Affinitätsbindung (z.B. Bindung an "heme binders"; Fitch 1983) oder mit Hilfe von Hämoxygenase den Hämring aufzuspalten.
Es konnte aber unter Verwendung empfindlicher kinetischer Methoden (3.9.3.) weder in CS noch in CR P. berghei eine Hämoxigenaseaktivität nachgewiesen werden.
Wenn der Parasit eine Hämoxygenase besäße, müßte man erwarten, daß es zu größeren Anstrengungen kommen sollte, um die neuen gebildeten Produkte Fe^{+++}, -Biliverdin und Bilirubin-, die ihrerseits giftig sind (Karp 1979) - zu entfernen oder zu entgiften.
Daneben würden bei einem Abbau des FP via Hämoxigenase große Mengen an Fe^{+++} (bei einem Hämoglobinabbau von 75 % wäre das eine F^{+++}-Konzentration im Erythrocyten von über 3,5 mM freiem Eisen) freigesetzt, das wiederum wegen seiner großen Toxizität (z.B. Lipidperoxidation) über ein eigenes Transportsystem aus der Zelle entfernt werden müßte.

Es ist daher wahrscheinlicher, daß der Parasit die beim Hämoglobinabbau anfallenden Hämeinheiten (Porphyrine, Ferriprotoporphyrin IX) als intaktes Häm eliminiert. Diese Hypothese wird unterstützt von der Feststellung, daß obwohl die Rattenleber Biliverdinreduktase (EC.1.3.1.24) - Aktivität parallel zur Parasitämie-Entwicklung in CS und CR-Infektion ansteigt, mehr Enzymaktivität (2 mal) in der CR-Infektion zu registrieren ist. (Abb. 30b)
Dies ist in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Eckman et al (1977), bei denen die Kohlenmonoxid-Entwicklung in mit CR und CS infizierten Mäusen gemessen wurde. Es zeigte sich, daß die mit CR-P. berghei infizierten Mäuse etwa 4 mal mehr Kohlenmonoxid abatmeten, als die mit CS-P. berghei infizierten Mäuse, ein Beweis für eine höhere Belastung der Wirtsleber mit Hämeinheiten. Die in dieser Arbeit durchgeführte Bestimmung der Kohlenmonoxid-Hämoglobin-Komplexe in CR-PE und

CS-PE zeigte keinen Unterschied, sodaß die beobachtete CO-Abatmung auf eine hohe Aktivität der Leber, d.h. Wirtshämoxygenase zurückzuführen ist.

Drei Plasmaproteine (Haptoglobin, Hämopexin und Albumin) sind verantwortlich für den Transport von Hämoglobin und Häm (Patman 1975) im Kreislauf.
Haptoglobin bindet Hämoglobin, das durch Hämolyse in der Gewebeflüssigkeit entstanden ist und transportiert es zur Leber (Hershko 1975, Jayele und Moretti 1962). Wenn durch einen Überschuß von Hämoglobin Haptoglobin verbraucht ist, wird Hämoglobin oxidiert und schließlich in Globin und Häm gespalten (Carlsson et al 1984). Hämopexin, das eine höhere Affinität zum Häm hat als Albumin, bindet und transportiert Häm zur Leber (Muller-Eberhard und Morgan 1975).
Wenn FP intakt aus der Zelle ausgeschleust wird, muß man daher besonders bei der CR (P. berghei) Infektion vermehrt Serum-Hämopexin fordern.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei täglicher Gabe von Chloroquin in der CR-Infektion zwei Proteine (T-1 und T-2) festgestellt, die zunahmen im Ablauf der Blutschizogoniezunahmen (Abb. 26 und 27). Ohne Chloroquin-Gabe wurde kein Unterschied zwischen gesundem Serum (mit oder ohne Chloroquin-Behandlung) und dem Serum aus CR- und CS-Infektionen beobachtet.

Das Malaria-Pigment nimmt eine zentrale Position in der Diskussion der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz in der Malaria-Prophylaxe ein (Schueler und Cantrell 1964; Cohen et al 1964; Peters 1964; Peters et al 1965; Thompson et al 1965; Jacobs 1965; Phifer et al 1966; Warhurst und Hockley 1967), obwohl dessen genaue chemische Natur (Zusammensetzung) immer noch umstritten ist. Die Entstehung des Malaria-Pigments setzt den Abbau von Hämoglobin (Brown 1911; Groman 1951, Morrison und Jeskey 1948) in den gebildeten Freßvakuolen (Aikawa 1966; Rudzinska und Trager 1957) voraus. Zur Aufklärung der chemischen Zusammensetzung des Malaria-Pigments haben viele Autoren

sich mit Isolierung des Malaria-Pigments aus den Parasiten oder Wirtsgeweben (Leber und Milz) in verschiedenen Lösungsmitteln und dessen eventuelle spektroskopische Charakterisierung beschäftigt. Ob bei diesen Methoden die Struktur des natürlichen Malaria-Pigments erhalten bleibt, ist nicht bekannt. Viele dieser Autoren setzten das Malaria-Pigment (Hemozoin) dem kristallinen Hämatin gleich (Devine und Fulton 1941; Fulton und Rimington 1953; Gosh und Nath 1934; Gosh und Sinton 1934; Morrison und Anderson 1942; Rimington und Fulton 1947; Sinton und Gosh 1934). Deegan und Maegraith (1956) postulierten, daß Hämozoin ausschließlich aus Hämatin, das mit "a nitrogenous moiety" verbunden ist, besteht. Dies wurde später von Sherman et al (1968) unterstützt. Sherman et al (1968) beschrieben "the nitrogeneous moiety" als denaturiertes Globin; was von Homewood et al (1972) in Frage gestellt wurde. Homewood et al (1972) schlugen vor, daß das Malaria-Pigment (Hemozoin) kein einfaches Abbauprodukt von Hämoglobin sei, sondern ein Produkt, das von den Parasiten aus Hämin (aus Hämoglobin) und anderen noch zu identifizierenden Substanzen synthetisiert werde.
Da Struktur und Funktion von biologischem Material eng miteinander verknüpft sind, sollte man zur Untersuchung der chemischen Struktur bzw. der Zusammensetzung von Malaria-Pigment möglichst schonende Methoden anwenden. Die bisherigen Methoden zur Untersuchung dieser Problematik garantieren die Nativität des Malaria-Pigments nicht; z.B. Extraktion mit

- Na_2CO_3/NaOH (Sinton und Gosh 1934; Gosh und Sinton 1934, Devine und Fulton 1941, 1942; Morrison und Anderson 1942)
- 90 % Phenol (Remington und Fulton 1947).

Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit folgender Weg zur Isolierung des Malaria-Pigments verwendet.
Das Malaria-Pigment wurde nach Auftrennung der parasitierten Erythrocyten nach Blutschizogonie (3.12.), Lyse der Erythrocyten in 4 % Triton X-100, Auftrennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten in IEF, Extraktion der Auftragstelle

(Auftragplättchen) in 1 % SDS-Lösung (in bidest. Wasser) mit anschließender spektrophotometrischer und durch SDS-PAGE-Analyse untersucht und die Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln festgestellt.
In jeder Extraktion von Malaria-Pigment muß die Extraktionsmethode zwei wichtige Voraussetzungen erfüllen (Deegan und Maegraith 1956):

1) Die Probe zur Extraktion muß so weit wie möglich frei von Hämoglobin sein.
2) Das Extraktionsmittel muß so weit wie möglich die Stabilität von immer noch vorhandenem Hämoglobin unabhängig von dessen Menge, garantieren.

Der in dieser Arbeit gezeichnete Weg der Pigment-Isolierung trennt Hämoglobin und andere Proteine vom Malaria-Pigment (durch IEF) und garantiert bis dahin die Nativität des Malaria-Pigments. Die anschließende SDS-PAGE-Analyse greift keine kovalenten Bindungen an und liefert deshalb, im Gegensatz zu den anderen Methoden, ein wahres Bild über die Zusammensetzung des Malaria-Pigments.
Ein Vergleich der Abbildungen 31 bis 34 läßt folgende Schlußfolgerung zu:

1) Das Spektrum von isoliertem Malaria-Pigment in äthanolischer KOH (0,1N KOH in 80 % Äthanol) ist mit dem von Hämin (Ferriprotoporphyrin IX-Cl) zu vergleichen, aber nicht mit dem von isoliertem Pigment in wässriger SDS-Lösung (1 %).
2) Charakteristisch für Hämin in 0,1N KOH in 80 % Äthanol, sind die Absorptions-Maxima bei 595 nm, 475 nm (klein), im Bereich der Soret-Bande bei 400 nm und deren Schulter bei 360 nm (Abb. 31 und 32).

In 1% SDS gelöstes Malaria-Pigment (Abb.33) zeigt ein charakteristisches und deutliches Absorptionsmaximum bei 645 nm und zwei kleine Maxima bei 555 nm und 510 nm, eine unscharfe Soret-Bande bei 400 nm mit kleinen Schultern bei 438 nm und 345 nm und weitere deutliche Maxima bei 275 nm und 235 nm.

Anhand dieser spektrophotometrischen Untersuchungen ist festzustellen, daß (1) die Anwendung von alkalischen Extraktionsmethoden zur Untersuchung des Malaria-Pigments ungeeignet sind, weil entweder das Pigment ins Hämatin umgewandelt wird oder das Hämatin in ein ähnliches Produkt wie das Malaria-Pigment umgewandelt wird (Polymerisation?).

(2) Das Malaria-Pigment ist nicht mit Hämatin (Ferriprotoporphyrin IX. Hydroxid) gleichzusetzen. Weil Struktur und Funktion von biologischem Material eng verknüpft sind, ist es fraglich, ob hinsichtlich des Mechanismus der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz Eigenschaften, die dem Hämatin zugeschrieben werden (Toxizität des Chloroquin-FP-Komplexes) auch für das Malaria-Pigment zutreffen.

SDS-PAGE des Malaria-Pigments zeigt, daß das Malaria-Pigment kein einheitliches chemisches Produkt darstellt (Abb. 36). Es ist ein Konglomerat von verschiedenen noch zu identifizierenden Komponenten mit Molekulargewichten von 14 KD bis 97 KD und darüber. Es ist ferner unwahrscheinlich, daß nicht kovalent-gebundenes Hämatin (MG 592) per se in nennenswertem Umfang das Malaria-Pigment ausmacht.
Homewood et al (1975) schreiben dem nicht covalent-gebundenen Häm einen Anteil von 10 % am isolierten Malaria-Pigment zu.

Die Löslichkeitseigenschaften (Tabelle 1) des mit der in dieser Arbeit angewendeten Methode isolierten Malaria-Pigments stimmen mit denen in der Literatur überein (Rimington und Fulton 1947; Warasi 1927, Wats and White 1932, Sinton und Gosh 1934).
Obwohl die in dieser Arbeit beschriebene Methode die Nativität des Malaria-Pigments garantiert, ist es nicht auszuschliessen, daß dies mit fremden Proteinen (z.B. Membranproteinen) kontaminiert sein kann. Diese Methode garantiert allerdings eine Untersuchung der Dynamik der Entstehung des Malaria-Pigments im Ablauf der Blutschizogonie und wird dazu beitragen, die Hypothese des partiellen Abbaus von Hämoglobin (Shermann et al.1968) zu untersuchen.

REVERSION, Stellenwert des Malaria-Pigments in der Malaria-Chemotherapie

Peters (1965) berichtete über einen Chloroquin-resistenten P. berghei Stamm, der nur resistent war, solange man ihn unter Chloroquin-Druck hielt; in der Abwesenheit von Chloroquin wurde die Chloroquin-Sensibilität wieder hergestellt mit gleichzeitigem Wiederauftreten vom Malaria-Pigment. Die Entwicklung von Chloroquin-Resistenz geht mit verminderter Pigment-Bildung, die nur elektronenmikroskopisch zu sehen ist, einher (Peters 1964, Peters 1965).
Diese Beobachtungen erwecken den Eindruck, daß das Erscheinen oder Verschwinden des Malaria-Pigments verantwortlich für die Chloroquin-Wirkung bzw. Chloroquin-Resistenz sein könnte. Die Fragestellung wurde daher nachgegangen.
Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten "Reversion"-Versuche führten einmal zu dem Ergebnis, daß das Absetzen der Chloroquin-Behandlung in der CR-Infektion nach 14 Tagen zur Wiederherstellung der Chloroquin-Sensibilität (Abb. 37) mit gleichzeitigem Erscheinen vom Malaria-Pigment führt.

Die Chloroquin-Ansprechbarkeit der revertierten Parasiten nahm im Laufe der Zeit zu (vergl. Abb. 37 und 39).

Wenn man unmittelbar nach der "Reversion" in den nachfolgenden Passagen eine Chloroquin-Therapie (85 mg Base / kg / Tag) durchführt, beobachtet man nach einem anfänglichen Abfall der Parasitämie (4-7 Tage post Infektionem), einen Anstieg der Parasitämie in 8 - 13 Tagen. Obwohl nach der Reversion die unmittelbar folgende Passage ohne Behandlung zum Tode der infizierten jungen Ratten führte, wurde mit einer Chloroquin-Behandlung (85 mg Base / kg / Tag) resistente Parasiten heraus selektiert (Abb. 38). Es muß daher in der anfänglichen Parasiten-Population eine Heterogenität der "Revertierbarkeit" (leicht revertierbare Parasiten und schwer oder weniger leicht revertierbare Parasiten) oder der Stabilität der Resistenz vorhanden sein. Dies stimmt überein mit der vorher

erwähnten zeitabhängigen Zunahme der Chloroquin-Sensibilität (Abb. 37 und 39).
Angesichts dieser Beobachtung liegt der Sinn einer ständigen Chloroquin-Gabe in der Parasiten-Passage darin, daß durch die wiederholte Spontan-Mutation (Bishop 1958, Bishop 1962) sensibel werdende Parasiten regelmäßig vernichtet werden und dadurch eine reine Chloroquin-resistente Parasiten-Population herausselektiert wird. Die simultane Wiederherstellung der Chloroquin-Sensibilität und die Erscheinung vom Malaria-Pigment nach der "Reversion" ist nicht ausreichend, um das Malaria-Pigment in einen Zusammenhang mit der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz zu bringen. Es muß auch gefragt werden, ob die Pigmentbildung nicht eine Nebenerscheinung ist, die nichts mit der eigentlichen Chloroquin-Wirkung zu tun hat. Es stellt sich weiter die Frage, ob das Malaria-Pigment obligatorisch für die Chloroquin-Wirkung bzw. -Resistenz ist. In der zweiten Chloroquin-Freie-Linie (CFL-2; Abb. 8) beobachtete man in den ersten 7 Monaten keine Veränderung in der Chloroquin-Resistenz und in der Art des Befalls (Reticulocyten). Allerdings wurde nach 8 Monaten die Chloroquin-Sensibilität ohne das gleichzeitige Erscheinen des sichtbaren Malaria-Pigments (Nachweis durch Wasser-Triton-Lyse und IEF) wieder hergestellt (Abb. 40).
Diese Beobachtung läßt die Schlußfolgerung zu, daß das Konglomerat (Malaria-Pigment / Hemozoin) nicht obligatorisch für die Chloroquin-Wirkung und -Resistenz ist. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Zhang et al (1985) an P. falciparum (in vitro) überein, wo festgestellt wurde, daß Chloroquin auf Ringstadien, die kaum oder wenig Pigment besitzen, wirkt. Die Entwicklung von CR- und CS- P. berghei in zwei verschiedenen "micro-enviroments" (Reticulocyten bzw. reife Erythrocyten), stellt ein großes Problem für die biochemische Untersuchung dieser Parasiten dar. Um diese Hürde zu überwinden, wird durch eine durch Phenylhydrazin induzierte Reticulocytose oder durch Entbluten (Slomianny et 1984) versucht diese Differenz

in der Art des Befalls zu eliminieren. Es ist aber fraglich, ob die in dieser Weise (d.h. Schock-Behandlung) erzeugten Reticulocyten mit den unter normalen Umständen gebildeten Reticulocyten zu vergleichen sind. Die Selektion zur Gewinnung eines Reticulocyten-befallenden CS P. berghei Stamms wäre die beste Möglichkeit, um diese Schwierigkeiten zu umgehen. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnene Chloroquin-Freie-Linie (CFL-2) gewinnt in dieser Hinsicht große Bedeutung, und würde die Interpretation biochemischer Daten erleichtern.

An Tieren verabreichtes Chloroquin wird sehr schnell aus dem Blutkreislauf entfernt, und es wird ein rbc/Plamsa-Verhältnis von 2 erreicht (Berliner 1948).

Erythrocyten, die mit Chloroquin-sensiblen P. berghei infiziert sind (CS-PE), konzentrieren mehr Chloroquin als die mit resistenten P. berghei infizierten (Macomber et al 1966, Fitch 1969).

Beim gesunden Menschen wird Chloroquin auch nach längerer Einnahme als Mutter-Substanz ausgeschieden (Titus et al 1948, Kuroda 1962, Mutting 1962, McChesney et al 1966).

Man kann daher davon ausgehen, daß Chloroquin durch den Wirt nicht metabolisiert wird und damit der Beitrag des Wirtsorganismus zur Chloroquin-Resistenz zu vernachlässigen ist.

Ein anderes Problem ist, ob der Malaria-Parasit selber zur Metabolisierung von Chloroquin in der Lage ist und damit die Chloroquin-Resistenz auf eine stimulierte oder induzierte Katabolisierung des Chloroquins selber zurückzuführen ist (Pankova et al 1983).

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zu den Ausscheidungsprodukten von Chloroquin in Urin von nicht infizierten und mit CS und CR P. berghei infizierten Versuchstieren zeigten einmal, daß auch vom nicht infizierten Tier, aber auch von den mit CR und CS infizierten Tieren, praktisch nur die Muttersubstanz wieder ausgeschieden wurde (Abb. 41).
Die hier angewendete Nachweis-Methode (3.19.) war relativ unempfindlich (250 nM Chloroquin als untere Nachweisgrenze).
Es wurde daher versucht, in vitro mit zwei humanpathogenen P. falciparum Zell-Linien (T9-96 als CS und T9-102 als CR) die Aufnahme und insbesondere eine mögliche Katabolisierung von Chloroquin durch den Parasiten mit 14-C-Chloroquin zu bestimmen.
Die in 3.20. beschriebenen Versuche zur Aufnahme von 14-C-Chloroquin zeigten, daß das Verhältnis von in die Zelle aufgenommene und nicht aufgenommene Radioaktivität beim CS Stamm 1,4 und beim CR Stamm 1 betrug.
An diesen Ergebnissen fällt zunächst auf, daß der "Konzentrierungseffekt" der für parasitierte Erythrozyten beschrieben wurde (Macomber et al. 1966)
nicht zu beobachten ist. Dies ist damit zu erklären, daß Chloroquin in diesem Versuch zu sehr jungen metabolisch aktiven Stadien zugegeben wurde, die aber noch wenig Pigment besitzen, was möglicherweise für einen "Konzentrationseffekt" verantwortlich ist. Die Intention dieses Versuchs war zu untersuchen, ob die stoffwechselaktiven Parasiten das angebotene Chloroquin metabolisieren. Wie die Radioaktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm zeigt (Abb. 42a), waren beim CS-Stamm und insbesondere auch bei dem CR-Stamm (Abb.42b) keine Metaboliten des 14-C-Chloroquins nachzuweisen.
Es scheint daher nach diesen Ergebnissen nicht wahrscheinlich, daß die Chloroquin-Resistenz auf eine Metabolisierung, d.h. Inaktivierung des Chloroquins durch den Parasiten zurückzuführen ist.

Prinzipiell bestätigt werden konnte jedoch, daß der chloroquin-resistente Stamm weniger Chloroquin aufnimmt, als der entsprechende sensible Stamm.

Enzymmuster in Chloroquin-sensiblen und -resistenten Plasmodien (P. falciparum und P. berghei)

Biochemische Unterschiede in Wirt und Parasit bieten mögliche Angriffspunkte für eine Chemotherapie. Während der Resistenzentwicklung könnten biochemische Veränderungen (strukturell und funktionell) der Parasiten stattfinden. Obwohl diese Veränderungen nicht unbedingt im Zusammenhang mit der Chloroquin-Resistenz stehen müssen, ist deren Erforschung von Bedeutung, weil sich angesichts der immer fortschreitenden Chloroquin-Resistenz neue Aspekte ergeben, die als neue Ansatzpunkte in der Malaria-Chemotherapie oder zumindest als Marker für die Chloroquin - Resistenz dienen könnten.
Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzymen GPI, 6PGD und LDH zeigen sich Unterschiede im Isoenzymmuster zwischen den Enzymen der Parasiten und denen der Wirtszelle (Abb. 43a-e). Das sind weitere Beweise dafür, daß der Malaria-Parasit für den Wirt eine phylogenetisch fremde Zelle ist. Es wurde jedoch auch festgestellt, daß der Chloroquin-resistente P. berghei Stamm sich in dem Isoenzymmuster vom Chloroquin-sensiblen Stamm stark unterscheidet (Abb. 43a-e). Der Chloroquin-resistente Stamm müßte sich physiologisch sehr stark von dem sensiblen Stamm unterscheiden. Es wird beschrieben, daß die Malaria-Parasiten sehr stark von der Wirtszelle abhängig ist (Trager 1941). Diese Abhängigkeit würde sich nicht nur auf einfache Ernährungs- und physicochemische Faktoren beschränken, sondern erstreckt sich auf Erythrocyten-Enzyme, Substrate und Metaboliten z.B. Abhängigkeit von erythrocytären CoA synthetisierenden Enzyme (Trager und Brohn 1975), die wiederum ATP von der Wirtszelle benötigen (Brohn und Trager 1975). Es wird auch beschrieben, daß der Malaria-Parasit von der Wirts-Zelle abhängig ist, weil sie keine G6PD-Aktivität besitzt (Eckman und Eaton 1979).

Das gilt allerdings nicht für den Parasiten, da für alle Malariaparisten eine NADP-abhängige Glutamatdehydrogenase nachgewiesen wurde über die theoretisch NADP reduziert werden kann. Auch für P. berghei CR und CS wurde eine Glutamatdehydrogenase nachgewiesen (Abb. 19a und 19b). Außerdem zeigte Picard-Maureau (1976), daß P. vinckei infizierte Erythrocyten in Korrelation zur Zunahme der Parasitenmasse im infizierten Erythrocyten $^{14}CO_2$ aus [1-^{14}C] markierter Glucose freisetzten. Das heißt, daß sie in großem Umfang 6 Phosphogluconat, das Endprodukt der G6PD zur Verfügung haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Aktivitätsanfärbung von IEF Gelen auf denen parasitäres Material von CR und CS P. berghei aufgetrennt wurde, möglicherweise eine parasitäre G6PD nachgewiesen werden. Die Enzymaktivität in den CR-Zellen schien im ganzen etwas höher zuliegen, als in dem CS-Stamm.
Diese Ergebnisse stimmen mit dem von Hempelmann und Wilson (1981) überein.
Allerdings müßte noch endgültig nachgewiesen werden, daß die G6PD nicht auf Verunreinigungen durch Leucocyten, Thrombocyten oder Reticulocyten zurückzuführen ist.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Chloroquin-sensiblen und Chloroquin-resistenten P. berghei in Rattenerythrocyten untersucht.

- Die Chloroquin-sensible P. berghei befällt überwiegend reife und junge Erythrocyten, während durch den Chloroquin-resistenten Stamm Reticulocyten parasitiert werden.
- Die Infektion der Ratten durch das Chloroquin-sensible P. berghei wird durch Chloroquin komplett abgeheilt; ohne Behandlung führt die Infektion zum Tode des Versuchstieres.
- Die Infektion der Ratte mit dem Chloroquin-resistenten P. berghei verläuft mit und ohne Chloroquin-Druck biphasisch und heilt grundsätzlich spontan ab.
- Der Chloroquin-sensible P. berghei Stamm bildet das mikroskopisch sichtbare Pigment während der Chloroquin-resistente Stamm pigmentfrei erscheint. Die Pigmentbildung unterbleibt beim sensiblen Stamm, wenn Reticulocyten befallen werden.

Das Absetzen des Chloroquins im Chloroquin-resistenten P. berghei führte zu zwei verschiedenen Entwicklungen.

- a) Ohne Chloroquinstress wird der CS Stamm innerhalb von 14 Tagen wieder sensibel für Chloroquin, gleichzeitig wird das Auftreten von Pigment beobachtet.
- b) Alternierendes Weglassen und erneute Gabe von Chloroquin führt zur Selektion einer Zell-Linie, die auch nach langer Chloroquin-freier Passage kein Pigment bildete und in gewissem Umfang wieder Chloroquin-sensibel wurde.

- Der Chloroquin-sensible und Chloroquin-resistente Stamm bautenim gleichen Umfang Protein ab; bei beiden Stämmen muß demnach Ferriprotoporphyrin IX freigesetzt werden. Im Chloroquin-sensiblen Stamm werden die aus dem Hämoglobin freigesetzten Ferriprotoporphyrine IX zum Malaria-Pigment umgewandelt, die Überführung des Ferriprotoporphyrins IX in das Pigment wird als Entgiftungsprozess interpretiert. Am Ende der Blutschizogonie des Chloroquin-sensiblen Stamms wird ca. 65 % des Gesamtporphyrineisens im Pigment gefunden. Der Gesamteisengehalt der Zelle ändert sich im Ablauf der Blutschizogonie der Chloroquin-sensiblen Zelle nicht.

- Im Chloroquin-resistenten P. berghei findet keine nennenswerte Pigmentbildung statt. Es wird bei der Chloroquin-resistenten Zelle bei der isoelektrischen Fokussierung eine zusätzliche negativ geladene eisenhaltige Bande gefunden (Bande X). Die Bande X wird in der Mitte und Endphase der Blutschizogonie vermehrt produziert. Diese Bande X wird als Ferriprotoporphyrin IX interpretiert. Der Gesamteisengehalt beim Chloroquin-resistenten Stamm nimmt im Ablauf der Blutschizogonie ab. Der Chloroquin-resistente Stamm entfernt das aus dem Hämoglobinabbau freigesetzte Ferriprotoporphyrin IX kontinuierlich aus der Zelle.

- Im Ablauf der Malaria-Infektion des Chloroquin-resistenten P. berghei unter Chloroquin-Druck, werden im Serum zwei Proteine mit dem Molekulargewicht von 27 KD und 57 KD gefunden. Diese Proteine werden als Transportproteine für die Hämeinheiten aus dem infizierten Erythrocyten angesehen. Die Herkunft dieser Proteine ist nicht geklärt.

- Die Entfernung des Ferriprotoporphyrins IX aus dem Chloroquin-resistenten P. berghei erfolgt nicht durch Abbau des Porphyrinskeletts im Parasiten. Es wurde keine Hämoxygenase oder Biliverdinreductase im infizierten Erythrocyten und in isolierten Parasiten nachgewiesen.

- In der Leber der mit Chloroquin-resistenten und Chloroquin-sensiblen P. berghei infizierten Versuchstiere wird eine Zunahme der Biliverdinreduktase-Aktivität beobachtet. Die Stimulierung dieses Enzyms ist unter der Infektion mit dem Chloroquin-resistenten Stamm größer als bei der Infektion mit dem Chloroquin-sensiblen Stamm.

- Das aus dem Chloroquin-sensiblen Stamm isolierte Malaria-Pigment ist ein Konglomerat von Molekülen verschiedener Molekulargewichte (14 KD - 43 KD und größer).
  Das Pigment zeigt eine deutliche Berliner Blau Reaktion und enthält zum Ferriprotoporphyrin IX eine zusätzliche Absorptionsbande bei 645 nm, die sich in alkalischem Milieu nach 600 nm verschiebt.

- Die Untersuchungen mit radioaktivem Chloroquin zeigten, daß Chloroquin weder vom Chloroquin-sensiblen noch von einem Chloroquin-resistenten Stamm metabolisiert wird. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die Chloroquin-Resistenz auf eine metabolische Inaktivierung von Chloroquin zurückzuführen ist.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Albert, A. (1975)
Outline Studies in Biology. The selectivity of drugs.
Chapman and Hall London, 7-11.

Aikawa, M. (1966)
The fine structure of the erythrocytic stages of three avian malarial parasites, Plasmodium fallax, P. lophurae and P. cathemerium.
Am. J. Trop. Med. and Hyg. 15, 449-471.

Aikawa, M. (1972)
High-resolution autoradiography of malarial parasites treated with ^{3}H-Chloroquine.
Am.J. Pathol. 67, 227-284.

Aissi, E., Charet, P., Bouquelet, S. and Biquet, T. (1983)
Endoprotease in P. yoelii nigeriensis.
Comp. Biochem. Physiol., 74B, 559-566

Asante, S.O. (1981)
Alternative Substrate der $NADP^{+}$-abhängigen GLDH (EC.1.4.1.4) aus P. vinckei und Hemmung der normalen $NADP^{+}$-abhängigen GLDH-Reaktion durch Chloroquindiphosphat (Resochin ^{R}).
Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Berliner, C.G., Welch, W.T., Conan, N.T., Baumann, E., Scudder, S.T. and Shannon, T.A. (1948)
Studies on the chemotherapy of the human malarias. VI. The physiological disposition, antimalarial activity and toxicity of several derivatives of 4-Aminoquinolines.
J.clin. Invest. 27, 98-107.

Beutler, E. (1975)
Red cell metabolism. A manual of biochemical methods.
2nd Edition. New York: Grune and Stratton.

Bishop, A. (1958)
Analysis of the development of resistance to metachloridine in clones of Plasmodium gallinaceum.
Parasitology 48, 210-234.

Bishop, A. (1962)
An analysis of the development of resitance to proguanil and pyrimethamine in Plasmodium gallinaceum.
Parasitology 52, 495-518.

Brohn, F.H. and Trager, W. (1975)
Coenzyme A requirement of malaria parasit : Enzymes of coenzyme A biosynthesis in normal duck erythrocytes and Erythrocytes infected with Plasmodium lophurae.
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 72, 2456-2458.

Brown, W.H. (1911)
Malarial pigment (so-called melanin): Its nature and mode of prcduction.
J. Expt. Med., 13, 290; 15, 579-597.

Burns, R.P. (1966)
Delayed onset of chloroquine retinopathy.
New Engl. J. Med. 275, 693-696.

Busvine, T.R. (1979)
Studies in Biology no. 55.
Arthropot Vectors and Diseases. Edward Arnold (Publishers) Ltd.

Campbell, C.S., Chin, W., Collins, W.E., Teutsch, S.M. and Moss, D.M. (1979)
Chloroquin-resistent Plasmodium faciparum from East Africa.
Lancet 1, 1151-1154.

Canfield, C.J. and Rozman, R.S. (1974)
Clinical testing of new antimalarial compounds.
Bull. WHO. 50, 203-212.

Carlsson, J., Höfling, J.F. and Sandquist, G.K. (1984)
Degratation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented Bacteroides species.
J. Med. Microbiol. 18, 39-46.

Carter, R. and McGregor, I.A. (1973)
Enzyme variation in Plasmodium falciparum in the Gambia.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 830-837.

Carter, R. and Voller, A. (1973)
Enzyme typing of Malaria Parasites
Br. Med. Journal 1, 149-150.

Carter, R. and Voller, A. (1975)
The distribution of enzyme variation in populations of Plasmodium falciparum in Africa.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 69, 371-376.

Chan, V.L. and Lee, P.Y. (1974)
Host-cell specific proteolytic enzyme in Plasmodium berghei infected erythrocytes.
Southeast Asian J. Trop. Med. Publish Health. 5, 447-449.

Charet, P., Aissi, E., Maurois, P., Boquelet, S. and Biqnet, J. (1980)
Amino peptidase in rodent Plasmodium.
Comp. Biochem. Physiol. 65B, 519-524.

Chou, A.C., Chevli, R. and Fitch, C.D. (1980)
Ferriprotoporphyrin IX fulfills the criteria for indentification as the chloroquine recetor of malaria parasites.
Biochemistry 19, 1543-1549.

Chou, A.C. and Fitch, C.D. (1980)
Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine chemotherapeutic implications.
J. Clin. Invest. 66, 856-858.

Chou, A.C. and Fitch, C.D. (1981)
Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX.
J. Clin. Invest. 68, 672-677.

Ciak, J. und Hahn, F.E. (1965)
Mode of action of Chloroquin.
Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Expl. biol. 24, 454.

Cohen, S.N., Phifer, K.O. and Yielding, K.L. (1964)
Complex formation between chloroquine and ferrihaemic acid in vitro, and its effect on the antimalarial action of chloroquine.
Nature, 202, 805-806.

Cook, L., Grant, P.T. and Kermack, W.O. (1961)
Proteolytic enzymes of the erythrocytic forms of rodent and simian species of malaria plasmodia.
Exp. Parasitol. 11, 372-379.

Cook, R.T., Aikawa, M., Rock, R.C., Little, W. and Sprinz, H. (1969)
The isolation and fractionation of Plasmodium knowlesi.
Mil. Med. 134, 866-883.

Cox, F.E.G. (1981)
Tha malaria parasites, Plasmodium Spp.
Biologist, 28, 9-17.

Deegan, T. and Maegraith, B.G. (1956a)
I - The Pigment of the simian species, Plasmodium knowlesi and Plasmodium cynomolgy.
Ann. Trop. Med. Parasit. 50, 194-211.

Deegan, T. and Maegraith, B.G. (1956b)
II - The Pigment of the Human species, Plasmodium falciparum and P. malariae.
Ann. Trop. Med. Parasit. 50, 212-222.

Deloron, P., Penalba, C., Le Bras, J., Michon, C., Verdier, F., Siamot, A.G. and Coulaud, J.P. (1983)
Paludiome A P.falciparum chloroquin-resistant en Afrique de l'est. A propos de deux observations.
Bull. Soc. Pathol. Ex. 76, 364-368.

Devine, T. and Fulton, T.D. (1941)
Observations on the nature of the malarial pigment present in infections of monkeys (Macacus Rhesus) with Plasmodium knowlesi.
Ann. Trop. Med. Parasit. 35, 15-22.

Devine, J. and Dulton, J.D. (1942)
The pigment fermet by Plasmodium gallinaceum Brumpt, 1939, in the domestic fowl.
Ann. Trop. Med. Parasit. 36, 167-170.

Eckman, J.R., Modler, S.V., Eaton, J.W., Berger, E. and Engel, R.R. (1977)
Host heme catabolism in drug-sensitive and drug-resistant malaria.
The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, St. Louis. 90, 767-770.

Eckman, J.R. and Eaton, J.W. (1979)
Dependence of Plasmodial glutathione metabolism on the host cell.
Nature 278, 754-756.

Ekue, J.M.K., Ulrich, A.M. and Nielesani, E.K. (1983)
Plasmodium malaria resistant to chloroquine in a Zambian living in Zambia.
Br. Med. J. 286, 1315-1316.

Felsher, B.F. und Redeker, G. (1966)
Effect of chloroquine in patients with porphyria cutanea tarta.
Medicine 45, 575.

Fernex, F. (1984)
Fortschritte in der Chemoprophylaxe der Malaria.
Internist. 25, 208-215.

Fitch, C.D. (1969)
Chloroquine resistance in malaria: A deficiency of chloroquine binding.
Proc. N.A.S., 64, 1181-1187.

Fitch, C.D. (1983)
Mode of Action of antimalarial Drugs. Malaria and the red Cell. Pitman, London
(Ciba Foundation Symposium 94) p. 222-232.

Fogh, S., Jepsen, S. and Effersøe, P. (1979)
Chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in Kenya.
Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 73, 228-229.

Fraser, D.M. and Kermack, W.O. (1957)
The inhibitory action of some antimalarial drugs and related compounds on the hexokinase of yeast and of Plasmodium berghei.
British J. Pharmacol. Chemother. 12, 16-23.

Fulton, J.D. and Grant, P.T. (1956)
The sulfur requirements of the erythorcytic form of Plasmodium knowlesi.
Biochem. J. 63, 274-282.

Groman, N.B. (1951)
Dynamic aspects of the nitrogen metabolism of Plasmodium gallinaceum in vivo and in vitro.
J. Infect. Dis. 88, 126-150.

Gyang, F.N., Poole, B. and Trager, W. (1982)
Peptidases from P. falciparum cultured in vitro.
Molec. Biochem. Parasitol. 5, 263-273.

Hempelmann, E. (1977)
Abbau von Wirtszell-Protein und Pigmentbildung in Plasmodium vinckei parasitierten Erythrocyten.
Dissertation, Universität Tübingen.

Hempelmann, E., Wilson, R.J.M. (1981)
Determination of G6PDH in malarial parasites.
Mol. Biochem. Parasitol. 2, 197-204.

Hershko, C. (1975)
The fate of circulating haemoglobin.
British Journal of Haematology 29, 199-204.

Homewood, C.A., Jewsbury, J.M. and Chance, M.L. (1972)
The pigment formed during haemoglobin digestion by malarial and schistosomal parasites.
Comp. Biochem. Physiol. 43B, 517-523.

Homewood, C.A., Moore, G.A., Warhurst, D.C. and Atkinson, E.M. (1975)
Purification and some properties of malarial pigment.
Ann. Trop. Med. Parasit. 69, 283-287.

Howells, R.E., Peters, W. and Thomas, E.A. (1968)
The chemotherapy of rodent malaria, III Host-parasite relationships. Part 3: The relationship between haemozoin formation and the age of the host cell.
Ann. Trop. Med. Parasit. 62, 267-270.

Howells, R.E., Peters, W., Homewood, C.A. and Warhurst, D.C. (1970)
The Theory of the mechanism of chloroquine resistance in rodent malaria.
Nature 228, 625-628.

Ibrahim, N.G., Nelson, J.C., and Lavere, R.D. (1981)
Control of δ-aminolaevulinate synthase and haem oxygenase in chronic iron-overloaded rats.
Biochemical Journal 200, 35-42.

Jacobs, R.L. (1965)
Selection of strains of Plasmodium berghei resistant to quinine, chloroquine and pyrimethamine.
J. Parasit. 51, 481-482.

Jayle, M.F. and Moretti, J. (1962)
Haptoglobin: biochemical, genetic and physiopathologic aspects.
Progress in Hematology 3, 342-359.

Jeffrey, H.C. and Leach, R.M. (1975)
Atlas of medical helminthology and protozoology.
2nd Edition. Churchhill Livingstone, Edinburgh, London and New York.

Jensen, J.B. and Trager, W. (1978)
Concentration from continuous cultivation of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of Plasmodium falciparum.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 27, 1274-1276.

Jepsen, S., Fogh, S., Peterslund, N. and Black, F. (1983)
RIII - RIII chloroquine resistant Plasmodium falciparum malaria from East Africa. Studies of one in vivo and in vitro response to Chloroquine.
Ann. Trop. Med. Parasit. 77, 349-354.

Jung, A., Corr, R., Backes, J., Haus, M., Schirmer, H., Spira, D.T. and Hempelmann, E. (1984)
How dependent is the Malaria on its host cell?
Hoppe-Seyler Zeitschrift für Physiologische Chemie, 356, 1009.

Karp, W.W. (1979)
Biochemical alterations in neonatal hyperbilirubinemia and bilirubin encephalopathy: A review.
Pediatrics 64, 361-368.

Kean, B.H. (1979)
Chloroquine-resistant falciparum malaria from Africa.
JAMA, 241, 395.

Kerbele, H. (1964)
The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 758-768.

König. R., Stegmann, H., Francksen, H. and Paul, H.L. (1970)
Protein subunits in the virus X group determination of the molecular weights by polyacrylamide electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 207, 184-189.

Königk, E. und Putfarken, B. (1983)
Inhibition of Ornithine decarboxylase of in vitro cultured Plasmodium falciparum by chloroquine.
Tropenmed. Parasitol. 34, 1-3.

Kuroda, Keigi (1962)
Detection and distribution of chloroquine metabolites in human tissues.
J. Pharmac. exp. Ther. 137, 156-161.

Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T_4.
Nature 227, 680-685.

Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979)
Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture.
J. Parasitol. 65, 418-420.

Levy, M.R. and Chou, S.C. (1973)
Activity and some properties of an acid proteinase from normal and Plasmodium berghei infected red cells.
J. Parasitol. 56, 1064-1070.

Levy, M.R. and Chou, S.C. (1974)
Some properties and susceptibility to inhibitors of parially purified acid proteases from Plasmodium berghei and from ghosts of mouse red cells.
Biochim. Biophys. Acta, 334, 423-430.

Levy, M.R., Siddiqui, W.A. and Chou, S.C. (1974)
Acid protease activity in Plasmodium falciparum and P. knowlesi and ghosts of their respective red cells.
Nature 247, 546-549.

Levy, M.R. and Chou, S. (1975)
Inhibition of macromolecular synthesis in the malarial parasites by inhibitors of proteolytic enzymes.
Exp. Parasitol. 31, 52-54.

Loehr, G.W. and Waller, M.D. (1970)
In Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U.)
Vol. 1, 673-681, Verlag Chemie, Weinheim.

Marchiafava, E. and Bignami, A. (1894)
On summer-autumn malarial fevers in the parasites of malarial fevers. Translation by Thomson, J.H.
The New Sydenham Society, London, 1-428.

McChesney, E.W., Conway, W.D., Banks, W.F.Jr., Rogers, J.E. and Shekosky, J.M. (1966)
Studies of the metabolism of some compounds of the 4-Amino-7-Chloroquine series.
J. Pharmac. exp. Ther. 151, 482-493.

McChesney, E.W., Fasco, M.J. and Banks, W.F.Jr. (1967)
The metabolism of Chloroquine in man during and after repeated oral dosage.
J. Pharmac. exp. Ther. 158, 323-331.

Macomber, P.B., O'Brien, R.L. and Hahn, F.E. (1966)
Chloroquine: Physiological basis of drug resistance in Plasmodium berghei.
Science, 152, 1374-1375.

McNamara, K.H., Rieckmann, K.H. and Powell, R.D. (1967)
Pigment in asexual erythrocytic form of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum.
Ann. Trop. Med. Parasit. 61, 125-127.

Moeschlin, S. et al (1962)
Erfahrungen mit Desferrioxamin bei pathologischen Eisenablagerungen.
Schweizerische Med. Wochenschrift 92, 1295-1306.

Moore, D.V. and Lanier, J.E. (1961)
Observations on two Plasmodium falciparum infections with abnormal response to chloroquine.
Ann. J. Trop. Med. Hyg. 10, 5-9.

Morrison, D.B. and Jesekey, H.A. (1948)
Alterations in some constituents of the monkey erythrocyte infected with Plasmodium knowlesi as related to pigment formation.
J. Nat. Malaria Soc. 7, 259-264.

Morslet, A.F.W., Glastra, A. and James, J. (1973)
Microspectrophotometric analysis of malaria pigment.
Exp. Parasitology. 33, 17-22.

Moulder, J.W. and Evans, Jr., E.A. (1946)
The biochemistry of the malaria parasite. VI. Studies on the nitrogen metabolism of the malaria parasite.
J. Biol. Chem. 164, 135-157.

Muller-Eberhard, U. and Morgan, W.T. (1975)
Porphyrin-binding proteins in serum.
Annals of the New York Academy of Sciences 244, 624-650.

Mütting, D. (1962)
Detection and metabolism of hydrochloroquine-sulfate and hydroxychloroquine diphosphate in human beings.
Nature 195, 1003-1004.

Noguchi, M., Yoshida, T. and Kikuchi, G. (1978)
Specific requirement of NADPH-cytochrome c reductase for the microsomal heme Oxygenase reaction yielding biliverding IX_{α}.
FEBS LETTERS 98, 281-284.

Oakley, B.R., Kirsch, D.R. and Morris, R.N. (1980)
A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.
Analytical Biochemistry 105, 361-365.

Ohkuma, S. and Poole, B. (1978)
Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3327-

Pankova, T.G., Igonina, T.M., Chekhonadskikh, T.V., Salganik, R.I., Rabinovic, S.A. and Maksakovskaya, E.V. (1983)
Activation of Microsomal Monooxygenases in Chloroquine-resistant Strains of Malarial Plasmodium as a possible reason of drug-stability.
Voprosy Meditsinskoi Khimii, 25(5), 63-65.

Pasvol, G. and Wilson, R.T.M. (1982)
The interaction of Malaria parasites with red blood cells.
British Medical Bulletin 38, 133-140.

Peters, W. (1964)
Pigment formation and nuclear division in chloroquine-resistant malaria parasites (Plasmodium berghei, Vincke and Lips 1948).
Nature 203, 1290-1291.

Peters, W., Fletcher, K.A. and Stäubli, W. (1965)
Phagotrophy and pigment formation in a chloroquine-resistant strain of Plasmodium berghei, Vincke and Lips, 1948.
Ann. Trop. Med. Parasit. 59, 126-134.

Peters, W. (1965)
Drug resistance in Plasmodium berghei, Vincke and Lips, 1948.
I. Chloroquine resistance.
Exp. Parasitol. 17, 80-89.

Peters, W. (1968)
The chemotherapy of rodent malaria, II. Host-parasite relationships, Part 2: The relationship between chloroquine sensitivity and the age of the host cell.
Ann. Trop. Med. Parasit. 62, 246-266.

Peters, W. (1970)
Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria.
Academic Press. London/N.Y.

Picard-Maureau, A. (1976)
Untersuchungen zum Stoffwechsel von Malaria-Parasiten, Glucose-Utilisation und Glutathion-Status parasitierter Erythrocyten in Abhängigkeit von der intraerythrocytären Entwicklung des Erregers einer Nagetiermalaria (P. vinckei).
Dissertation, Universität Tübingen.

Pollack, S. und Campana, T. (1980)
Low molecular weight of nonheme iron in a highly labelled heme pool in the reticulocyte.
Blood, 56, 564-566.

Putnam, F.W. (1975)
Alpha, Beta, Gamma, Omega. The roster of the Plasma proteins.
In: Putnam, F.W. (ed). The plasma proteins.
Structures, function and genetic Control.
Vol. 1. Academic Press, New York 57-131.

Richterich, R. (1968)
Carbomonoxy-Hämoglobin Spektralphotometrie.
In Klinische Biochemie Theorie und Praxis.
2. Auflage, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt a.M.

Rimington, D., Fulton, J.D., Sheinman, H. (1947)
The pigment of the malaria parasites Plasmodium knowlesi
and Plasmodium gallinaceum.
Biochem. J. 41, 619-622.

Rollo, I.M. (1968)
Partition profiles and their possible relation to the
chloroquine resistance in Plasmodia.
Fedn. Proc. Fedn. Am. Socs. Expt. Biol. 27, 537.

Rudzinska, M.A. and Trager, W. (1957)
Intracellular phagotrophy by malarial parasites: an electron
microscope study of Plasmodium lophurae.
J. Protozool. 4, 190-199.

Rüssmann, L. (1978)
Biochemische Untersuchungen an einer experimentellen
Malaria.
Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Schmid, E. (1970)
In Methoden der enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U.)
Vol. 1, 607-616, Verlag Chemie, Weinheim.

Schueler, F.W. and Cantrell, W.F. (1964)
Antagonism of the antimalarial action of Chloroquine by ferrihaemate and an hypothesis for the mechanism of Chloroquine resistance.
J. Pharmac. exp. Ther. 143, 278-281.

Sergent, E. and Poncet, A. (1959)
Des variations expérimentales de la virulence de Plasmodium berghei.
Archs. Inst. Pasteur Algèr 37, 227-255.

Sherman, I.W., Ting, I.P. and Ruble, J.A. (1968)
Characterization of the malaria pigment (Hemozoin) from the avian malaria parasite Plasmodium lophurae.
J. protozool. 15, 158-161.

Sherman, I.W. and Taniogoshi, L. (1970)
Incorporation of ^{14}C-Amino acids by malaria (Plasmodium lophurae):
IV. In vivo untilization of host cell haemoglobin.
Int. J. Biochem. 1, 635-637.

Sherman, I.W. and Taniogoshi, L. (1983)
Purification of Plasmodium lophurae cathepsin D and its effect on erythrocyte membrane proteins.
Molec. Biochem. Parasitol. 8, 207-226.

Shviro, T., Zilber, I. and Shaklai, N. (1982)
The interaction of hemoglobin with Phosphatidylserine vesicles.
Biochim. Biophys. Acta 687, 63-70.

Singleton, J.W. and Lastner, L. (1965)
Biliverdin reductas of guinea pig liver.
Journal of Biological Chemistry 240, 4780-4789.

Sinton, J.A. and Gosh, B.N. (1934)
Studies of malarial pigment (haemozoin).
Pt.I: Investigation of the action of solvents on haemozoin and the spectroscopical appearances observed in the solutions.
Rec. Malar. Surv. India 4, 15.

Slomianny, C., Prensier, G. and Charet, P. (1948)
Relation between haemoglobin degradation and maturity of the red blood cell infected by P. berghei.
Comp. Biochem. Physiol. 78B, 891-896.

Tenhunen, R., Marver, H., Pimstone, N.R., Trager, W.F., Cooper, D.Y. and Schmid (1972)
Enzymatic degratation of Heme. Oxidative cleavage requiring cytochrome P-450.
Biochemistry 11, 1716-1720.

Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. (1968)
The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase.
Proc. Natl. Acad. Sci. 61, 748-755.

Thompson, P.E., Bayles, A., Olszeweski, B. and Waitz, J.A. (1965)
Quinine-Resistant Plasmodium berghei in mice.
Science 148, 1240-1241.

Theakston, R.D.G., Fletcher, K.A. and MaeGraith, B.G. (1970)
The use of electron microscope autoradiography for examining the uptake and degradation of haemoglobin by Plasmodium berghei.
Ann. Trop. Med. Parasitol. 64, 63-71.

Titus, E.C., Craig, L.C., Golumbic, C., Mighton, H.R., Wempen, I.M. and Elderfield, R.C. (1948)
Identification by distribution studies. IX. Application to metabolic studies of 4-Aminoquinoline Antimalarials.
J. Org. Chem. 13, 33-62.

Trager, W. (1941)
Studies on conditions affecting survival in vitro of a malarial parasite (Plasmodium lophurae).
J. Exp. Med. 74, 441-462.

Trager, W. and Brohn, F.H. (1975)
Coenzyme A requirement of Malaria parasites: Effects of Coenzyme A precursors on extracellular development in vitro of Plasmodium lophurae.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 1834-1837.

Trager, W. and Jensen, J.B. (1976)
Human malaria parasites in continuous culture.
Science 193, 674-675.

Treumer, J. (1983)
Biochemische Untersuchungen zum Eisen-Stoffwechsel der erythrocytären Formen von Malariaerregern (Plasmodium vinckei).
Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Walliker, D., Sanderson, A., Yoeli, M. and Hargreaves, B.J. (1976)
A genetic investigation of virulence in a rodent malaria parasite.
Parasitology. 72, 183-194.

Warasi (1927)
Nature of Hemozoin.
Review in Trop. Dis. Bull., 25 (7), p 575.

Warhurst, D.C. and Hockley, D.T. (1967)
Mode of action of chloroquine on P. berghei and P. cynomolgi.
Nature 214, 935-936.

Wats, R.C. and White, W.I. (1932)
The malarial Pigment (Haemozoin) in the spleen.
Ind. Jour. Med. Res. XIX, 945-950.

Weinberg, E.D. (1978)
Iron and Infection.
Microbiological Reviews 42, 45-66.

Wernsdorfer, W.H. (1983)
Extension of Chloroquine-resistant malaria in 1983. ^{13}th International Congress of chemotherapy. Vienna. 28.8.-2.9.1983.
Proceedings, part 21, 6-9 Ed. Spitzky, K.H. and Karrer, K.

WHO Technical Report Series no. 529, P. 48, 1973.

Wood, P.A., Rock, L.M. and Eaton, W. (1984)
Chloroquine resistance and host cell haemoglobin catabolism in Plasmodium berghei.
Malaria and the Red Cell p. 159-169.
1984 Alan, R., Liss. Inc. 150 Fith avenue, New Your, NY 10011.

Yayon, A., Bauminger, E.R., Ofer, S. and Ginsburg, H. (1984)
The Malaria Pigment in Rat infected Erythrocytes and its interaction with Chloroquine. A mössbauer effect study.
The Journal Biological Chem., 259, 8163-8167.

Yayon, A., Cabantchik, Z.I. und Ginsburg, H.
EMBO J., in press.

Zhang, Y., Asante, K.S.O. and Jung, A. (1985)
Stage-dependent inhibition of chloroquine on Plasmodium falciparum in vitro.
Submitted (1985).

LEBENSLAUF

Name	Kofi S. O. Asante
Geburtstag	25. Dezember 1950
Geburtsort	Asuboi, in der Ost-Region von GHANA
Familienstand	verheiratet seit 27. Jan. 1980 mit Mabel Yeboah Akyeampong aus Akyem Banso, GHANA
Kinder	Kwasi Ntiri Safo-Asante

Ausbildung:

1) In Ghana	
Primary School	1955-1961 Aduhima Roman Catholic Primary School.
Middle School	Asubio Presbyterian Middle Mixed-School
Secondary School	Sept. 1963 - Juni 1970
a) General Certificate of Education (G.C.E. Ordinary-Level)	1963 - 1967 at Ghana Secondary School, Koforidua.
b) General Certificate of Education, Advanced-Level (G.C.E. A-Level)	Oktober 1968 - Juni 1970 at Ghana Secondary School, Koforidua
University	
Bachelor of Science degree (Honours) in Biochemistry (B.Sc.Hons.Biochem.)	Oktober 1970 - Juni 1974 at the University of Science and Technology, Kumasi.
National Service	September 1974 - September 1975
2) In FRG	
Sprach Schule Goethe Institut, Schwäbisch Hall	Okt. 1975 - März 1976

Aufenthalt bei Prof. Dr. E.L. Sattler, Strahlenzentrum der Universität Gießen.	April 1976 - März 1977
Studium der Biochemie an der Universität Tübingen.	SS 1977 - SS 1981
Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke und Betreuung von Herrn Dr. A. Jung am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.	Okt. 1980 - Juni 1981

Thema: Alternative Substrate der NAPD-abhängigen GLDH (EC 1.4.1.4) aus P.vinckei und Hemmung der normalen NADP-abhängigen GLDH Reaktion durch Chloroquindiphosphat (Resochin $^{(R)}$)

Promotion bei Prof. Dr. D. Mecke am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.	Sept. 1981 - April 1985

Thema: Untersuchungen zum Hämoglobinabbau und dem Mechanismus der Chloroquin-Wirkung und -Resistenz in Chloroquin-sensiblen und -resistenten Erregern einer experimentellen Nagetiermalaria (P. berghei NK 65).

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Bayer, Prof. Braun, Prof.Guglielmi, Prof. Hagenmaier, Prof. Mecke, Prof. Metzner, Prof. Probst, Prof. Remmer, Prof. Wendel, Prof. Weser, Prof. Zähner.